



<p>(51) 国際特許分類6 C12N 5/00, C12Q 1/04, A61K 35/14, 38/17</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/03972</p> <p>(43) 国際公開日 1999年1月28日(28.01.99)</p>									
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03143</p> <p>(22) 国際出願日 1998年7月13日(13.07.98)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平9/203900</td> <td>1997年7月15日(15.07.97)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平9/203917</td> <td>1997年7月15日(15.07.97)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願平10/14736</td> <td>1998年1月12日(12.01.98)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 資酒造株式会社(TAKARA SHUZO CO., LTD.)[JP/JP] 〒612-8061 京都府京都市伏見区竹中町609番地 Kyoto, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 竹迫一任(TAKESAKO, Kazutoh)[JP/JP] 〒520-0822 滋賀県大津市秋葉台4-20-208 Shiga, (JP) 糠谷育衛(NUKAYA, Ikuei)[JP/JP] 〒617-0002 京都府向日市寺戸町洪川16-A-205 Kyoto, (JP) 安本雅純(YASUMOTO, Masazumi)[JP/JP] 〒525-0033 滋賀県草津市東草津一丁目4-34 Shiga, (JP) 岩崎朋子(IWASAKI, Tomoko)[JP/JP] 〒523-0814 滋賀県大津市本丸町6-56-503 Shiga, (JP)</p>		特願平9/203900	1997年7月15日(15.07.97)	JP	特願平9/203917	1997年7月15日(15.07.97)	JP	特願平10/14736	1998年1月12日(12.01.98)	JP	<p>出野美津子(IDENO, Mitsuko)[JP/JP] 〒616-8176 京都府京都市右京区太秦乾町28-7 Kyoto, (JP) 秋吉 毅(AKIYOSHI, Tsuyoshi)[JP/JP] 〒874-0000 大分県別府市大字鶴見4546番地の102 Oita, (JP) 藤江達郎(FUJIE, Tatsuo)[JP/JP] 〒874-0000 大分県別府市大字鶴見字鶴見原4547番地3-303 Oita, (JP) 田中文明(TANAKA, Fumiaki)[JP/JP] 〒874-0910 大分県別府市石垣西十丁目1-17-B02 Oita, (JP) 加藤郁之進(KATO, Ikunoshin)[JP/JP] 〒611-0028 京都府宇治市南陵町1-1-150 Kyoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 細田芳徳(HOSODA, Yoshinori) 〒540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目8番1号 大手前M2ビル 細田国際特許事務所 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, CN, JP, KR, US, ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
特願平9/203900	1997年7月15日(15.07.97)	JP									
特願平9/203917	1997年7月15日(15.07.97)	JP									
特願平10/14736	1998年1月12日(12.01.98)	JP									
<p>(54)Title: CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES</p> <p>(54)発明の名称 細胞傷害性Tリンパ球</p> <p>(57) Abstract Cytotoxic T lymphocytes (CTL) capable of recognizing cells presenting on the surface thereof complexes of at least one antigen peptide selected from among human major histocompatibility antigen (HLA)-A24-restrained antigen peptides represented by any of the amino acid sequences of SEQ ID NOS:1 to 6 and functional derivatives thereof with HLA-A24 molecules; carcinostatics containing the above CTL; a method for inducing the above CTL; inducers for the above CTL; carcinostatics containing at least one antigen peptide selected from among the above HLA-A24-restrained antigen peptides and functional derivatives thereof; antigen presenting cells which present on the surface thereof complexes of at least one antigen peptide selected from among the above HLA-A24-restrained antigen peptides and functional derivatives thereof with HLA-A24 molecules; CTL inducers containing the above antigen presenting cells; carcinostatics containing the above antigen presenting cells; methods for detecting cells sensitive to the above CTL; agents for detecting cells sensitive to the above CTL which contain the above CTL; and methods for detecting HLA molecules.</p>											

(57)要約

配列番号 1 ～ 6 のいずれかに記載のアミノ酸配列で表されるヒト主要組織適合性抗原 (HLA) - A 2 4 拘束性抗原ペプチド及びその機能的誘導体から選択される少なくとも一つの抗原ペプチドと HLA - A 2 4 分子との複合体を細胞表面に提示する細胞を認識する細胞傷害性 T リンパ球 (CTL)、該 CTL を含有する制がん剤、該 CTL の誘導方法、該 CTL の誘導剤、該 HLA - A 2 4 拘束性抗原ペプチド及びその機能的誘導体から選択される少なくとも一つの抗原ペプチドを含有する制がん剤、前記 HLA - A 2 4 拘束性抗原ペプチド及びその機能的誘導体から選択される少なくとも一つの抗原ペプチドと HLA - A 2 4 分子との複合体を細胞表面に提示した抗原提示細胞、該抗原提示細胞を含有する CTL の誘導剤、該抗原提示細胞を含有する制がん剤、該 CTL に感受性の細胞の検出方法、該 CTL を含有する該 CTL に感受性の細胞の検出剤、並びに HLA 分子の検出方法が提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TC	ターゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボワール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	ジンバブエ
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー		
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		

明細書

細胞傷害性Tリンパ球

技術分野

本発明は、がんの治療及び診断に有用な細胞傷害性Tリンパ球（細胞障害性Tリンパ球と記載される場合もある）（cytotoxic T lymphocytes ; 以下、CTLと略す）及び該CTLを誘導する際等に有用なCTL誘導剤に関する。

背景技術

CTLには、抗原ペプチドと主要組織適合性抗原遺伝子複合体（major histocompatibility gene complex ; 以下、MHCと略す）にコードされる主要組織適合性抗原MHCクラスI（ヒトの場合 human leukocyte antigen クラスIと呼ばれ、以下、HLAクラスIと略す）分子との結合物である複合体を特異的なT細胞レセプター（T cell receptor ; 以下、TCRと略す）によって認識し、その複合体を細胞表面に提示している細胞を傷害することのできるものがある。このようなCTLは自身と同じMHCクラスI分子を有する標的細胞のみを認識し傷害することから、MHCクラスI分子拘束性CTLと呼ばれる。したがって該細胞傷害反応が成立するためには、1）特異的TCRを持ったCTLが存在すること、2）HLAクラスI分子に提示されCTLに認識される抗原ペプチドとなるために、MHCクラスI抗原分子との結合だけでなく、TCRによる認識を受ける複合体を形成できる抗原ペプチドが存在すること、が必要である。

すなわち本明細書における「抗原ペプチド」とは、MHCクラスI分子に結合しMHCクラスI分子との複合体形成能を有すると共に該複合体が特異的なCTLのTCRによって認識される抗原性を有するペプチドを意味する。また本明細書における「HLA拘束性抗原ペプチド」とはMHCクラスI分子がHLA分子

である抗原ペプチドであることを意味する。なお本明細書における「ペプチド」とは、アミノ酸のみからなるホモメリックペプチドに特に限定されず、非アミノ酸成分を含むヘテロメリックペプチドをも包含する。アミノ酸も天然型に特に限定されず、化学修飾されたアミノ酸であってもよい。また本明細書におけるペプチドは単量体に限定されず、多量体であってもよい。

このような抗原ペプチドは、例えば哺乳類細胞の細胞内で合成された抗原等が小胞体でプロセスされ、小さいエピトープペプチドに分解されることにより生じ、更にMHCクラスI分子と会合し、細胞表面に提示される。すなわち、多くのサブユニットよりなるプロテオソーム複合体の中で、タンパク質は8～15アミノ酸よりなるペプチドに分解され、そのうちのいくつかがTAPトランスポーターにより細胞質から小胞体に運ばれる。これらのペプチドは小胞体でクラスI/ β 2ミクログロブリン(microglobulin)のヘテロダイマーに結合できれば、3分子複合体として安定化され、ゴルジ装置を通して、細胞表面に輸送される。腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原タンパク質を発現している腫瘍細胞は、腫瘍細胞表面にTリンパ球に認識される、MHCクラスI分子拘束性抗原ペプチドを提示できるはずである。

Tリンパ球に認識される最初の腫瘍特異抗原として、T. ブーン(T. Boon)らによりメラノーマ(melanoma)抗原E(以下、MAGEと略す)と呼ばれる遺伝子がクローニング、同定された〔P. ファンデルブルガン(P. van der Bruggen)ら、サイエンス(Science)、第254巻、第1643～1647頁(1991)〕。彼らは、メラノーマ患者由来のCTLクローン、及びそのCTLに認識される同じ患者由来の一連のメラノーマ細胞株、そしてそれらのうちいくつかはそのCTLに耐性であるように免疫選択された株を用いて、発現クローニング法によりMAGEを単離した。すなわちCTLに認識されたメラノーマ細胞株より調製したある5kbのDNA断片を元々認識されなかった細胞株に形質導入すると、上記CTLクローンによって認識されるようになること

が示された。このDNA断片は推定分子量26,000のタンパクをコードしていた。このタンパクをコードした遺伝子はMAGE-1と呼ばれているがmRNA分析によって、転移性だけでなく初期段階のメラノーマ由来の40%の細胞株がMAGE-1を発現していることが示された。該タンパク由来の抗原はHLA-A1拘束性であり、MAGE-1特異的CTLクローンは、HLAクラスI分子の一種であるHLA-A1分子に結合した、配列番号7に記載した9アミノ酸配列からなるペプチド配列(EADPTGHSY)を認識した〔C.トラヴァーサリ(C. Traversari)ら、ジャーナル オブ イクスペリメンタル オブ メディシン(Journal of Experimental of Medicine)、第176巻、第1453～1457頁(1992)〕。

腫瘍抗原として知られているものは多くのものがあるが、現在CD-8陽性のCTLに認識されるものとしては、上記のMAGE-1を始めとして10種以上存在することが知られているMAGEファミリー、gp 100、チロシナーゼ(tyrosinase)、またがん胎児性抗原(carcinoembryonic antigen; 以下、CEAと略す)、HER2/neu等がよく知られている。CTLに認識されるものは、腫瘍抗原タンパク質由来のペプチドであり、HLA クラスI分子との複合体として提示される。

HLA クラスI分子は主としてHLA-A、-B、-Cがあり、これらに結合して提示される抗原ペプチドは、9～10個のアミノ酸よりなり、更に各々のHLA分子によって異なる一定の構造上の特徴があることが知られている。例えば、世界的に最も頻度の高いHLA-A2.1分子に結合するペプチドとしてはN末端より2番目にLeu、且つC末端にLeu又はValを有する9～10個のアミノ酸よりなるペプチドが最も良く知られているものである。また、日本人を始めとするアジアの人種に多いHLA-A24分子に結合するペプチドはN末端より2番目にTyr、Phe、Met、Trpのいずれか、且つC末端にLeu、Ile、Trp、Pheのいずれかを有する9～10個のアミノ酸よりなるものであるペプチドが最もよく知られている〔A. コ

ンドー (A. Kondo) ら、ジャーナル オブ イムノロジー (Journal of Immunology)、第155巻、第4307～4312頁(1995)】。

現在までに抗原ペプチドが同定されている腫瘍抗原としては、HLA-A1に対するMAGE-1、MAGE-3、HLA-A2.1に対するMAGE-3、MART1、チロシナーゼ、gp100、HER2/neu、CEA等、HLA-Cw1に対するMAGE-3、HLA-B44に対するMAGE-3等、HLA-A2.4に対してはチロシナーゼ、 β -カテニン (c a t e n i n) 等がある。CEA由来の抗原ペプチドに関しては、配列番号34に示した9個のアミノ酸配列からなるペプチドがHLA-A2.1拘束性抗原ペプチドとして同定されている [ジャーナル オブ ナショナル キャンサー インスティテュート (Journal of National Cancer Institute)、第87巻、第982～990頁(1995)]。同様に、HER2/neu由来の抗原ペプチドに関しては、配列番号35又は36に示した9個のアミノ酸配列からなるペプチドがHLA-A2.1拘束性抗原ペプチドとして同定されている [ジャーナル オブ エクスペリメンタル メディシン、第181巻、第2109～2117頁(1995)、キャンサー リサーチ (Cancer Research)、第54巻、第1071～1076頁(1994)]。これらの中の多くは、まず腫瘍細胞を認識するクラスI拘束性のCTLを株化し、このCTLの認識する腫瘍抗原を同定し、続いて遺伝子工学的方法により腫瘍抗原タンパク質中最小単位を見出し、更にHLAクラスI分子への結合モチーフに関する情報を基に最小単位中のペプチドが見出されている [Y. カワカミ (Y. Kawakami) ら、Proceedings of the National Academy of the Science of the United States of America)、第91巻、第3515～3519頁(1994)]。また、まず前記のHLAクラスI分子結合ペプチドに共通したモチーフ構造を基に、腫瘍抗原タンパク質中のHLAクラスI分子結合ペプチドを見出し、続いて抗原提示細胞を利用してCTLを誘導可能なものを選択した後、

最終的に腫瘍細胞に対して傷害性を有するCTLが誘導できているかどうかにより抗原ペプチドが決定されている〔E. セリス (E. Celis) ら、プロシーディングズ オブ ザ ナショナル アカデミー オブ サイエンシーズ オブ ザ U S A、第 9 1 巻、第 2 1 0 5 ～ 2 1 0 9 頁 (1 9 9 4)、B. ゴーグラー (B. Gaugler) ら、ジャーナル オブ イクスペリメンタル オブ メディシン、第 1 7 9 巻、第 9 2 1 ～ 9 3 0 頁 (1 9 9 4) 〕。

一方、HLAクラスI分子はいくつかのサブタイプに分類されるが、その保有サブタイプの種類は人種間で大きく異なり、世界的にはHLA-A2が最も多く、白色人種の45%を占めている。そして、このHLA-A2拘束性の抗原ペプチドの同定が最も進んでいる。日本人ではHLA-A2は40%を占めるが、そのサブタイプを見ると白色人種と同じHLA-A * 0201は20%で、残りの多くはA * 0206である。これらのサブタイプへの結合ペプチドは異なり、主として研究されているHLA-A2はHLA-A * 0201である。一方、日本人ではHLA-A24 が60%以上を占めており、このHLA-A24 はアジア人種では他の人種に比べて比率が高い。しかし、現在までにこのHLA-A24 拘束性の抗原ペプチドが発見されている腫瘍抗原として上記のチロシナーゼ、 β -カテニンがあるが、その解析は非常に遅れている。したがってアジア人種、特に日本人において腫瘍細胞特異的に作用するCTLの解析も遅れており、腫瘍治療に有用なCTLの提供が不可能であった。本発明の目的は該CTLを提供することにある。

発明の開示

本発明の第1の態様は、配列番号1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列で表されるHLA-A24 拘束性抗原ペプチド及びその機能的誘導体から選択される少なくとも1つの抗原ペプチドとHLA-A24 分子との複合体を細胞表面に提示する細胞を認識するCTLに関する。本発明の第2の態様は、第1の態様のCTLを有効成分とする制がん剤に関する。本発明の第3の態様は、第1の態様の

C T Lの誘導方法に関する。本発明の第4の態様は、配列番号1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列で表されるH L A－A 2 4拘束性抗原ペプチド及びその機能的誘導体から選択される少なくとも一つの抗原ペプチドを有効成分とするC T Lの誘導剤に関する。本発明の第5の態様は、配列番号1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列で表されるH L A－A 2 4拘束性抗原ペプチド及びその機能的誘導体から選択される少なくとも一つの抗原ペプチドを有効成分とする制がん剤に関する。本発明の第6の態様は、配列番号1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列で表されるH L A－A 2 4拘束性抗原ペプチド及びその機能的誘導体から選択される少なくとも一つの抗原ペプチドとH L A－A 2 4分子との複合体を細胞表面に提示する抗原提示細胞に関する。なお本明細書ではH L A－A 2 4拘束性抗原ペプチドとH L A－A 2 4分子との複合体を細胞表面に提示する細胞として、「標的細胞」なる語と「抗原提示細胞」なる語を使用する。本明細書において「標的細胞」とは該細胞を特異的に認識するC T Lにより傷害を受ける細胞とする。一方、本明細書において「抗原提示細胞」とはM H C分子と共に抗原を提示しTリンパ球の活性化を惹起する機能を有する細胞を意味し、特に断りのない限りM H C分子がH L A－A 2 4分子である細胞とする。また本明細書における「抗原提示能を有する細胞」とは該細胞に存在するM H C分子と抗原ペプチドが複合体を形成することにより抗原提示細胞となることができる細胞を意味し、特に断りのない限りM H C分子がH L A－A 2 4分子である細胞とする。本発明の第7の態様は、第6の態様の抗原提示細胞を有効成分とするC T Lの誘導剤に関する。本発明の第8の態様は、第6の態様の抗原提示細胞を有効成分とする制がん剤に関する。本発明の第9の態様は、第1の態様のC T Lを被検細胞と接触させた際に生じる変化を指標として該C T Lに感受性の細胞の検出方法に関する。なお本明細書における「被検細胞」とは、末梢血リンパ球、組織等の体外摘出試料由来のヒト細胞又は株化細胞である。また本明細書における「感受性細胞」とは、C T Lにより認識され細胞溶解あるいはサイトカイン遊離を引き起こされる腫瘍

細胞をはじめとする、異常細胞を意味する。本発明の第10の態様は、第1の態様のCTLを有効成分として含有することを特徴とする該CTLに感受性の細胞の検出剤に関する。更に、本発明の第11の態様は、HLA拘束性抗原ペプチド、及びその機能的誘導体から選択される少なくとも一つの抗原ペプチド存在下、該抗原ペプチドとHLA分子との複合体を認識可能なCTLを被検細胞と接触させることを特徴とするHLA分子の検出方法に関する。

本発明者らは、腫瘍抗原であるMAGE-3タンパク質中のHLA-A24結合モチーフを有するペプチドを中心として多くの候補ペプチドの中から抗原ペプチドを探索した結果、配列番号1又は2で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを用いると、HLA-A24を発現している健常人の末梢血単核球より該腫瘍抗原発現細胞を選択的に傷害するCTLを誘導できることを明らかにした。同様に、腫瘍抗原である各種タンパク質中のHLA-A24結合モチーフを有するペプチドを中心とした候補ペプチドの中からHLA-A24拘束性抗原ペプチドを探索した結果、MAGE-1タンパク質アミノ酸配列中に存在する配列番号3で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、CEAタンパク質アミノ酸配列中に存在する配列番号4又は5で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、更にHER2/neuタンパク質アミノ酸配列中に存在する配列番号6で表されるアミノ酸配列からなるペプチドを用いると、HLA-A24を発現している健常人の末梢血単核球より該腫瘍抗原発現細胞を選択的に傷害するCTLを誘導できることを明らかにし、本発明を完成させた。

図面の簡単な説明

第1図は、抗原ペプチドMA3-2の刺激により誘導したエフェクター細胞の、標的細胞に対する特異的細胞傷害活性を示す図である。

第2図は、抗原ペプチドMA3-4の刺激により誘導したエフェクター細胞の、標的細胞に対する特異的細胞傷害活性を示す図である。

第3図は、抗原ペプチドMA 3-2の刺激により誘導したエフェクター細胞の、各種がん細胞に対する特異的細胞傷害活性を示す図である。

第4図は、抗原ペプチドMA 3-4の刺激により誘導したエフェクター細胞の、各種がん細胞に対する特異的細胞傷害活性を示す図である。

第5図は、抗原ペプチドMA 1-1の刺激により誘導したエフェクター細胞の、各種標的細胞に対する特異的細胞傷害活性を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の第1の態様は、配列番号1～6いずれかに記載のアミノ酸配列で表されるHLA-A 24拘束性抗原ペプチド及びその機能的誘導体から選択される少なくとも一つの抗原ペプチドとHLA-A 24分子との複合体を細胞表面に提示する細胞を認識するCTLであり、該CTLは標的細胞に対して特異的に細胞溶解又はサイトカイン遊離反応等を起こす。なお、本明細書におけるCTLはHLA-A 24分子上に提示された抗原ペプチドの抗原性を認識し傷害活性を有するものを指し、その他の抗原性認識などにより限定されるものではない。

本明細書において、HLA-A 24拘束性抗原ペプチドの機能的誘導体とは、HLA-A 24分子との複合体形成能を有すると共に、形成された複合体が配列番号1～6いずれかに記載のアミノ酸配列で表される抗原ペプチドとHLA-A 24分子との複合体を認識するCTLに認識されるものを意味する。例えば、配列番号1～6いずれかに記載のアミノ酸配列で表されるペプチドのアミノ酸配列において、1又は数個のアミノ酸が、欠失、他のアミノ酸若しくはアミノ酸アナログに置換、及び／又は1又は数個のアミノ酸若しくはアミノ酸アナログの付加、又はそれらの組み合わせによってアミノ酸配列は異なるが、HLA-A 24分子との複合体形成能を有すると共に、形成された複合体が本発明のCTLに認識されるペプチドであり、ジスルフィド結合等によるペプチドの2量体も含まれる。機能的誘導体のアミノ酸配列長は、9～10が好ましいが、これに特に限定され

ない。なお、本明細書におけるアミノ酸アナログとは、種々のアミノ酸のN-アシル化物、O-アシル化物、エステル化物、酸アミド化物、アルキル化物等を意味する。

また、HLA-A24分子との複合体がCTLに認識されれば、抗原ペプチドのN末端や遊離のアミノ基は、ホルミル基、アセチル基、t-ブトキシカルボニル(t-Boc)基等が結合していてもよい。また、HLA-A24分子との複合体がCTLに認識されれば、抗原ペプチドのC末端や遊離のカルボキシル基は、メチル基、エチル基、t-ブチル基、ベンジル基等が結合していてもよい。同様にHLA-A24分子との複合体がCTLに認識されれば、抗原ペプチドに含まれるシステインのチオール基はアセトアミドメチル基、メトキシベンジル基等が結合していてもよい。

機能的誘導体は、配列番号1～6いずれか記載のアミノ酸配列で表される抗原ペプチドとHLA-A24分子との複合体を認識するCTLを用いることにより同定することが出来、例えば、下記方法が挙げられる。

第1の方法は、機能的誘導体としての候補物質とHLA-A24発現細胞を混合し、HLA-A24分子に未結合の候補物質を洗浄後、CTLと反応させる。候補物質特異的な、細胞傷害性、サイトカイン遊離、又は増殖反応が認められれば機能的誘導体であると判断出来る。

第2の方法としては、候補物質を抗原提示能を有する細胞に添加し、適当な時間、例えば、抗原が細胞内に取り込まれプロセッシングを受け、抗原ペプチドとHLA分子複合体が細胞表面に提示されるために要する時間、反応させた後、CTLと反応させる。候補物質特異的なサイトカイン遊離又は増殖反応が認められれば、該物質は機能的誘導体であると判断出来る。

第3の方法としては、後述の抗原提示能を有する細胞上のHLA-A24分子上にペプチドを提示させることが可能な発現ベクターに候補物質のアミノ酸配列をコードする核酸を結合させ、該組換えベクターにより形質転換された抗原提示

能を有する細胞とCTLを反応させる。候補物質特異的なサイトカイン遊離又は増殖反応が認められれば、該物質は機能的誘導体であると判断出来る。

上記機能的誘導体としては、例えば、配列番号1～6いずれかに記載のアミノ酸配列で表されるペプチドのアミノ酸配列において、HLA-A24分子への結合を強めるために、N末端より2番目のアミノ酸がHLA-A24分子に結合するペプチドに特徴的なTyr、Phe、Met、Trpより選択されるアミノ酸に置換、及び／又はC末端のアミノ酸がHLA-A24分子に結合するペプチドに特徴的なLeu、Ile、Trp、Pheより選択されるアミノ酸に置換されたペプチドのうち、HLA-A24分子との結合能を有し、HLA-A24分子との複合体が配列番号1～6いずれかに記載のペプチドとHLA-A24分子との複合体をCTLに認識されるペプチドが挙げられる。

また、配列番号1～6いずれかに記載のアミノ酸配列の1又は数個のアミノ酸が置換されたアミノ酸配列で表されるペプチドにおいて、置換されるそれぞれのアミノ酸と側鎖の類似したアミノ酸若しくはアミノ酸アナログに置換したペプチドのうち、HLA-A24分子と結合能を有し、HLA-A24分子との複合体が本発明のCTLに認識されるペプチドも挙げられる。側鎖の類似したアミノ酸としては、例えば、グリシン(Gly)とアラニン(Ala)；バリン(Val)、イソロイシン(Ile)、ロイシン(Leu)とメチオニン(Met)；アスパラギン(Asn)とグルタミン(Gln)；アスパラギン酸(Asp)とグルタミン酸(Glu)；セリン(Ser)とスレオニン(Thr)；リジン(Lys)とアルギニン(Arg)；フェニルアラニン(Phe)とチロシン(Tyr)が挙げられる。

例えば、配列番号4に示す抗原ペプチドの機能的誘導体として、N末端より6番目のアミノ酸(Val)をIleに置換した配列番号24に記載のアミノ酸配列で表されるペプチド、N末端より8番目のアミノ酸(Gly)をAlaに置換した配列番号46に記載のアミノ酸配列で表されるペプチドが挙げられる。一方

、配列番号 5 に示す抗原ペプチドの機能的誘導体として、N 末端より 6 番目のアミノ酸 (Val) を Ile、Met にそれぞれ置換した配列番号 53、55 に記載のアミノ酸配列で表されるペプチド、又は N 末端より 4 番目のアミノ酸 (Cys) を Cys のチオール基と 4, 5-ジヒドロキシー-2-シクロペンテン-1-オン (4, 5-dihydroxy-2-cyclopenten-1-one : 以下 DHCP と略す) との反応により得られる生成物に置換した配列番号 33 に記載したペプチドが挙げられる。なお、N 末端より 4 番目のアミノ酸は、Cys のチオール基と N-エチルマレイミド (N-Ethylmaleimide)、ジチオスレイトール (Dithiothreitol)、4-ビニルピリジン (4-Vinylpyridine) との反応により得られる生成物であってもよい。

また、上記機能的誘導体としては、側鎖の類似していないアミノ酸の置換であってもよく、例えば、配列番号 1~6 いずれかに記載のアミノ酸配列で表されるペプチドのアミノ酸配列において、1 又は数個のアミノ酸が他のアミノ酸又はアミノ酸アナログ、例えば、Ala に置換したアミノ酸配列で表されるペプチドのうち、HLA-A24 分子と結合能を有し、HLA-A24 分子との複合体が配列番号 1~6 いずれかに記載のペプチドと HLA-A24 分子との複合体を認識する CTL に認識されるペプチドが挙げられる。

例えば、配列番号 4 に示す抗原ペプチドの機能的誘導体として、配列番号 39、40、42~45、48 いずれかに記載のアミノ酸配列で表されるペプチド、配列番号 5 に示す抗原ペプチドの機能的誘導体として、配列番号 26、27、30、32 に記載のアミノ酸配列で表されるペプチドが挙げられる。

なお、上記ペプチドのうち Ala に置換可能である位置のアミノ酸は、本来のアミノ酸と異なる更に他のアミノ酸、又はアミノ酸アナログに置換できる可能性がある。例えば、配列番号 5 に記載のアミノ酸配列で表される抗原ペプチドの 4 番目のアミノ酸は、Ala の他、Asp、Glu 等の酸性アミノ酸以外のアミノ酸

若しくはアミノ酸アナログに置換することができる。例えば、配列番号 5 1 又は 5 2 記載のアミノ酸配列で表される、S e r 又は G l y で置換されたペプチドが挙げられる。

また、ジスルフィド結合等によるペプチドの 2 量体としては、システインのチオール基を介したジスルフィド結合による配列番号 5 記載のアミノ酸配列で表されるペプチドの 2 量体が例示される。

上記の他、例えば配列番号 1 に記載されたアミノ酸配列からなるペプチドの機能的誘導体には、配列番号 1 記載のアミノ酸配列からなるペプチドを用いて誘導した C T L に認識される、M A G E - 3 を始めとする M A G E ファミリータンパク質由来のペプチドも含まれる。同様に配列番号 2 に記載されたアミノ酸配列で表されるペプチドの機能的誘導体には、配列番号 2 記載のアミノ酸配列で表されるペプチドで誘導した C T L に認識される、M A G E - 3 を始めとする M A G E ファミリータンパク質由来のペプチドも含まれる。配列番号 3 に記載されたアミノ酸配列で表されるペプチドの機能的誘導体には、配列番号 3 記載のアミノ酸配列で表されるペプチドで誘導した C T L に認識される、M A G E - 1 を始めとする M A G E ファミリータンパク質由来のペプチドも含まれる。

配列番号 4 に記載されたアミノ酸配列からなるペプチドの機能的誘導体には、配列番号 4 記載のアミノ酸配列からなるペプチドを用いて誘導した C T L に認識される、C E A 及び非特異的交差反応性抗原 (n o n - s p e c i f i c c r o s s - r e a c t i n g a n t i g e n : N C A) 由来のペプチドも挙げられる。配列番号 5 に記載されたアミノ酸配列で表されるペプチドの機能的誘導体には、配列番号 5 記載のアミノ酸配列で表されるペプチドで誘導した C T L に認識される、C E A 及び N C A 由来のペプチドも挙げられる。

以下、本明細書において配列番号 1 又は 2 で表されるペプチド及びその機能的誘導体を M A G E - 3 抗原ペプチド並びに配列番号 3 で表されるペプチド及びその機能的誘導体を M A G E - 1 抗原ペプチドと総称する。同様に配列番号 4 又は

5で表されるペプチド及びその機能的誘導体をCEA抗原ペプチド、配列番号6で表されるペプチド及びその機能的誘導体をHER2/neu抗原ペプチドと総称する。以下本明細書において使用する「抗原ペプチド」とは、特に断りの無い限りMAGE-3抗原ペプチド、MAGE-1抗原ペプチド、CEA抗原ペプチド及び/又はHER2/neu抗原ペプチドから任意に選択されたペプチドであることを示す。

抗原ペプチド及びその誘導体は、液相又は固相のアミノ酸のカップリングによる有機化学的方法により調製することができる。また、抗原ペプチドのアミノ酸配列をコードした核酸を用いた組換えDNA技術を利用しても調製することができる。組換えDNA技術によって得られたペプチドは必要に応じ適当な有機化学的又は生化学的手法等を用いることにより、修飾してもよい。

本発明のCTLにおいて、MAGE-3抗原ペプチドを用い誘導されたCTLはHLA-A24及びMAGE-3共に陽性の腫瘍細胞を、MAGE-1抗原ペプチドを用い誘導されたCTLはHLA-A24及びMAGE-1共に陽性の腫瘍細胞を、CEA抗原ペプチドを用い誘導されたCTLはHLA-A24及びCEA共に陽性の腫瘍細胞を、HER2/neu抗原ペプチドを用い誘導されたCTLはHLA-A24及びHER2/neu共に陽性の腫瘍細胞を、それぞれ選択的に傷害できることから腫瘍に対する細胞医薬として、また該CTL感受性細胞の検出等に使用することができる。

本発明の第2の態様は第1の態様のCTLを有効成分とする制がん剤に関する。該制がん剤は、該CTLを医薬的に許容される希釈剤に懸濁した形で提供される。なお、ここで言う希釈剤とは例えば該CTLの保存に適した培地、生理食塩水、又はリン酸緩衝生理食塩水である。培地としてはRPMI、AIM-Vなどの培地が一般的に挙げられる。また該制がん剤には医薬的に許容される担体が安定化の目的で添加されていてもよい。なおここで言う担体とはヒト血清アルブミン等である。該制がん剤には第1の態様のCTLを、CTL1種類当り $10^4 \sim$

10^8 個/ml、好ましくは $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$ 個/ml 含有させる。

上記制がん剤をヒトに投与する場合注射器で投与することができ、成人1人当りの投与量としては通常CTL数が、CTL1種類当り $10^6 \sim 10^{10}$ 個となるようにする。なお上記範囲は目安でありこれに限定されるものではない。また有効成分であるCTLは投与するヒト由来のものであるため、該制がん剤の毒性は特に認められない。

本発明の制がん剤は、有効成分として含有するCTLが認識可能な抗原ペプチドを発現している腫瘍細胞を有するがん患者に投与されるが、例えば、MAGEは当初メラノーマ患者の悪性腫瘍細胞から同定された抗原であるが、その後メラノーマ以外のがん患者の約10～50%の頻度で発現していることが確認されている。MAGE-1、MAGE-2又はMAGE-3の発現している腫瘍細胞としてはメラノーマのほか、例えば肺がん、乳がん、頭けい部がん、胃がん、食道がん、膀胱がん等に由来する腫瘍細胞が挙げられる〔B. ゴーグラー (B. Gajdler) ら、ジャーナル オブ イクスペリメンタル オブ メディシン、第179巻、第921～930頁(1994)〕。したがって、例えば、MAGE-3抗原ペプチドを用い誘導された本発明の第1の態様のCTLを有効成分として含有する制がん剤はHLA-A24及びMAGE-3共に陽性の腫瘍細胞よりなる上記がんを有する患者の治療に有用である。

なお、上記制がん剤を用いる場合他の制がん剤と併用してもよいが、免疫抑制的に働く制がん剤の併用は好ましくない。

本発明の第3の態様は、第1の態様のCTLの誘導方法に関する。該CTLは、配列番号1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列で表されるHLA-A24拘束性抗原ペプチド及びその機能的誘導体から選択される少なくとも一つの抗原ペプチドを使用することにより誘導することができる。

イン ビトロ (in vitro) で該CTLを誘導する場合、例えばHLA-A24を発現している生体よりの体外摘出試料を用い誘導することができる。

本明細書における体外摘出試料とは、血液のほか、手術などにより摘出したリンパ節、脾臓、その他各種臓器が包含され、これらの試料に存在するリンパ球や浸潤リンパ球細胞が好適に使用される。

例えば血液を用いる場合、HLA-A24陽性のヒト血液より調製した末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cells; 以下、PBMCと略す)より得られるリンパ球に繰り返し抗原刺激を与えることによりCTLを誘導することができる。抗原刺激は、例えばリンパ球を調製した同一血液より調製した抗原提示能を有する細胞に抗原ペプチドをHLA-A24分子との複合体として細胞表面に提示した抗原提示細胞等を用いることにより実施できる。誘導されたCTLは、更に抗CD-3抗体等による刺激や抗原ペプチド存在下各種刺激を加え増殖させることができる。例えばIL-7存在下、PBMCより調製したリンパ球1に対し抗原提示細胞を0.01~1の割合で混合することによりCTL誘導を実施することができる。別の態様として、IL-7及びキーホール リムペット ヘモシアニン(Keyhole Limpet Hemocyanin; KLH)存在下、PBMCに抗原ペプチドを細胞培養液中、抗原ペプチド1種類当り1ng/ml~100μg/ml、好ましくは10ng/ml~1μg/ml添加することによりCTL誘導を実施することができる。

誘導されたCTLは、クローン化することにより安定した細胞傷害性を有するリンパ球として維持することもできる。例えば、誘導されたCTLに抗原、各種サイトカイン、抗CD3抗体刺激を与えることにより増殖させることができる。

誘導された特異的CTLは、CTLを誘導した抗原ペプチドと放射性物質等で標識した標的細胞に対する傷害性、放射能の取り込みによって測定できるCTL増殖の抗原特異的な増加若しくはCTLや標的細胞より抗原特異的に遊離されるGM-CSF、IFN-γ等のサイトカイン量を測定することにより検出するこ

とができる。その他蛍光色素等によって標識された抗原ペプチドや複合体の使用によって直接確認することもできる。この場合、例えばCTLをCTL特異的抗体とカップリングさせた第1蛍光マーカーと接触させてから第2蛍光マーカーとカップリングさせた抗原ペプチド-MHC複合体を接触させ、そして二重標識細胞の存在をFACS (fluorescence-activated cell sorting) 分析によって行することができる。

一方、インビボ (in vivo) におけるCTLの誘導は、例えば抗原ペプチドとHLA-A2.4分子との複合体として細胞表面に提示した抗原提示細胞を生体に投与することにより実施することができる。ヒトに投与する場合、成人1人当たりの投与量は通常 $10^4 \sim 10^8$ 個である。別法として、抗原ペプチドを適当なアジュバントと混合し生体に投与することにより、該ペプチドに特異的なCTLを誘導することもできる。アジュバントとしては、①フロイント (Freund) 完全アジュバント、②フロイント不完全アジュバント、③水酸化アルミニウム、みょうばん等の無機物ゲル、④リゾレシチン、ジメチルオクタデシルアンモニウムブロミド等の界面活性剤、⑤硫酸デキストラン、ポリIC等のポリアニオン、⑥ムラミルペプチド、タフトシン等のペプチド、⑦リビ (Ribi) 社製のモノホスホリルリピド (monophosphoryl lipid; MPL) A等があるが、特に限定されない。生体におけるCTLの誘導には抗原ペプチドとアジュバントの混合物のほか、MHCクラスII拘束性のヘルパーT細胞抗原ペプチドを混合し投与してもよい。なお、該抗原ペプチドは生体内における安定化のため適当なリンカーを介して高級脂肪酸やヘルパーT細胞抗原ペプチドと共有結合させ投与してもよい。ヒトに投与する場合、成人1人当たりの投与量は抗原ペプチド濃度として、抗原ペプチド1種類当たり $0.1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10 \text{mg}/\text{kg}$ 、好ましくは $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 1 \text{mg}/\text{kg}$ 、更に好ましくは $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \mu\text{g}/\text{kg}$ である。

CTLを誘導するための抗原ペプチドによる刺激のために、抗原ペプチドとH

HLA-A24分子との複合体を用いることもできる。この場合HLA-A24分子は天然のHLA-A24分子である必要はなく、抗原ペプチドとの結合性を本質的に保存している断片であってもよい。これらの断片は、例えば、天然のHLA-A24分子のタンパク分解又は組換えDNA技術により調製することができる。この複合体は β_2 -ミクログロブリン、更に複合体を認識する抗体を共存させて安定化させることができる。

本発明の第4の態様は、配列番号1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列で表されるHLA-A24拘束性抗原ペプチド及びその機能的誘導体から選択される少なくとも一つの抗原ペプチドを有効成分としたCTL誘導剤に関する。CTL誘導剤は、抗原ペプチドを単独又は他の分子（ヘルパーT細胞抗原ペプチド及び／又はアジュバント）との混合物として生理食塩水又はリン酸緩衝生理食塩水に懸濁した形で供給される。該抗原ペプチドは、高級脂肪酸やヘルパーT細胞抗原ペプチドとの共有結合体あるいはHLA-A24分子との複合体としてもよい。該誘導剤には抗原ペプチドを、抗原ペプチド1種類当り0.01～100重量%、好ましくは0.1～95重量%含有させる。

該CTL誘導剤は、インビトロで本発明のCTLを増殖させるための培地への添加物、Tリンパ球増殖活性、遅延型皮膚反応を指標とした免疫感作状態の診断などに利用することができる。例えば培地への添加物として使用する場合、使用量は培地中のペプチド濃度として、抗原ペプチド1種類当り1ng/ml～100 μ g/ml、好ましくは10ng/ml～1 μ g/mlである。

本発明の第5の態様は、配列番号1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列で表されるHLA-A24拘束性抗原ペプチド及びその機能的誘導体から選択される少なくとも一つの抗原ペプチドを有効成分とした制がん剤に関する。該制がん剤は、1) 抗原ペプチドを単独、2) 抗原ペプチドと医薬的に許容される担体及び／又は希釈剤との混合物、又は3) 更に必要ならば上記1) 若しくは2) に補助剤を加えた形で提供される。なおここで言う担体とは例えば、ヒト血清アルブミ

ンであり、また希釈剤とは例えばリン酸緩衝液、蒸留水、生理食塩水等である。また補助剤とは薬学的に許容される上記アジュバント等が挙げられる。該制がん剤をヒトに投与する場合、注射器で投与することもできるし、噴霧等の方法で粘膜からの経皮吸収等で投与してもよい。該制がん剤には抗原ペプチドを、抗原ペプチド1種類当たり0.01～100重量%、好ましくは0.1～95重量%含有させる。成人1人当りの投与量はペプチド濃度として、抗原ペプチド1種類当たり0.1 μ g/kg～10mg/kg、好ましくは1 μ g/kg～1mg/kg、更に好ましくは1 μ g/kg～100 μ g/kgである。なおヒトに投与した場合、該ペプチドの毒性は特に認められない。

該制がん剤を使用する場合、他の制がん剤と併用してもよいが免疫抑制的に働く制がん剤の併用は好ましくない。

本発明の第6の態様は、配列番号1～6のいずれかに記載のアミノ酸配列で表されるHLA-A24拘束性抗原ペプチド及びその機能的誘導体から選択される少なくとも一つの抗原ペプチドとHLA-A24分子との複合体をその細胞表面に提示する抗原提示細胞に関する。以下、本明細書における「抗原提示細胞」とは、特に断りの無い限りMAGE-3抗原ペプチド、MAGE-1抗原ペプチド、CEA抗原ペプチド及び／又はHER2/neu抗原ペプチドから選択される少なくとも一つの抗原ペプチドを提示した抗原提示細胞を示す。該抗原提示細胞は、本発明のCTLの誘導に用いることができる。

該抗原提示細胞は、抗原提示能を有する細胞を用いることにより調製することができる。抗原提示能を有する細胞には、例えば抗原ペプチドとHLA-A24分子との複合体をその細胞表面に提示することが可能な、マクロファージやB細胞、樹状細胞（DC：dendritic cells）を始めとする白血球細胞が挙げられる。DCは、細胞当たり抗原提示量が多く、また抗原提示に必要な細胞表面分子（CD80、CD86等のコスティミュラトリー・シグナル（co-stimulatory signal）分子等）の発現量も高いため抗原提示能を有する細胞

として特に好適である。上記抗原提示能を有する細胞は、本明細書における体外摘出試料より調製することができる。例えばDCは、1) PBMCよりいくつかの細胞表面マーカー等を基に単離精製してくる、2) 単球よりGM-CSFとIL-4により誘導してくる、3) CD-34陽性細胞よりGM-CSF、TNF- α 、SCF等のサイトカインで誘導してくる等いずれかの方法により調製することができる。

抗原提示能を有する細胞表面に抗原ペプチドを提示させるには、例えば上記抗原提示能を有する細胞と抗原ペプチドの少なくとも一つを混合後必要に応じて過剰量を洗浄し、HLA-A24分子上に抗原ペプチドを負荷させる方法が挙げられる。なお、上記抗原提示能を有する細胞の調製方法における1)の方法で調製した細胞のように、既にHLA-A24分子上に本発明とは無関係の抗原ペプチドを提示していると考えられる細胞は、抗原ペプチドを負荷する前に酸処理などを行うことにより、HLA-A24分子上に存在する本発明のCTLを誘導出来ないペプチドを除去してもよい。該抗原提示能を有する細胞は単一の抗原ペプチドが負荷された細胞のほか、細胞1個当たり数種類の抗原ペプチドが負荷されていてもよい。また、別法として、B細胞やCD34陽性細胞に対して上記抗原ペプチドを提示させることのできる発現ベクターにより該細胞を形質転換する方法が挙げられる。このようなベクターとしては、pcDNA3、pMQMneo、pCEP4等の市販のプラスミドに、組換えDNA技術によって細胞表面に提示させたい抗原ペプチドの少なくとも1つをコードする遺伝子を組込んだ、発現用プラスミドベクターが挙げられる。更に該発現ベクターは、細胞表面に提示させたい抗原ペプチドの両端に細胞内で効率良くプロテアーゼの分解を受けるように適当なアミノ酸配列をコードする遺伝子が付加されていてもよい。更に、レトロウィルスベクターやアデノウィルスベクターも好適に利用される。

抗原提示細胞は、非増殖性とすることが好ましい。細胞を非増殖性とするためには、X線等の放射線照射又はマイトマイシン(mitomycin)等の薬剤による処理を行えばよい。

本発明の第 7 の態様は、第 6 の態様の抗原提示細胞を有効成分として含有する C T L の誘導剤に関する。該誘導剤は、該抗原提示細胞を、細胞の保存に適した培地、生理食塩水、又はリン酸緩衝生理食塩水に懸濁した形で供給される。培地としては R P M I、A I M-V、X-V I V O 1 0 などの培地が一般的である。また該培地又は緩衝液には血清アルブミン等を安定化の目的で添加してもよい。該誘導剤には抗原提示細胞を、抗原提示細胞 1 種類当り $10^3 \sim 5 \times 10^6$ 個 / m l、好ましくは $10^4 \sim 10^6$ 個 / m l 含有させる。

該 C T L の誘導剤は、イン ビトロで本発明の C T L を増殖させるための培地への添加物としての利用のほか、T リンパ球増殖活性を指標とした免疫感作状態の診断などにも利用することができる。例えば培地への添加物として使用する場合、C T L へ誘導するリンパ球 1 に対し通常 0.01 ~ 1 の割合で用いる。

本発明の第 8 の態様は、第 6 の態様の抗原提示細胞を有効成分として含有する制がん剤である。該制がん剤は、該抗原提示細胞を医薬的に許容される希釈剤に懸濁した形で提供される。ここで言う希釈剤とは、細胞の保存に適した培地、リン酸緩衝液、生理食塩水等である。培地としては R P M I、A I M-V、X-V I V O 1 0 などの培地が一般的に挙げられる。また、該制がん剤には医薬的に許容される担体を安定化のために添加してもよい。ここで言う担体とは、ヒト血清アルブミン等である。該制がん剤には抗原提示細胞を、抗原提示細胞 1 種類当り $10^5 \sim 10^8$ 個 / m l、好ましくは $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^7$ 個 / m l 含有させる。該制がん剤をヒトに投与する場合注射器で投与することができ、成人 1 人当りの投与量は抗原提示細胞数として、抗原提示細胞 1 種類当り通常 $10^4 \sim 10^8$ 個である。なお、上記範囲はあくまで目安であり、これに限定されるものではない。また、有効成分である抗原提示細胞は投与するヒト由来のものであるため、該制がん剤の毒性は特に認められない。

該制がん剤を使用する場合、他の制がん剤と併用してもよいが免疫抑制的に働く制がん剤の併用は好ましくない。

本発明の第 9 の態様は、第 1 の態様の C T L を被検細胞と接触させた際に生じる変化を指標とした該 C T L の感受性細胞の検出方法に関する。C T L と被検細胞中の感受性細胞との接触により生じる変化としては、例えば C T L による標的細胞溶解、サイトカイン遊離、又は C T L の増殖が挙げられる。標的細胞溶解の検出は、例えばラジオアイソトープや蛍光色素により被検細胞を標識後 C T L と混合した際に、被検細胞より遊離されるラジオアイソトープ量や蛍光色素量を測定することにより実施できる。サイトカイン遊離の検出は、C T L 又は被検細胞からの GM-CSF、TNF、IFN- γ 等の遊離量を測定することにより実施することができ。また C T L の増殖は、 3 H-チミジンの細胞への取り込み量の測定や、顕微鏡観察などによる C T L 細胞数の測定などにより実施することが出来る。この変化により、被検細胞中に存在する H L A-A 2 4 及び M A G E-3 共に陽性若しくは H L A-A 2 4 及び M A G E-3 関連抗原共に陽性の腫瘍細胞、H L A-A 2 4 及び M A G E-1 共に陽性若しくは H L A-A 2 4 及び M A G E-1 関連抗原共に陽性の腫瘍細胞、H L A-A 2 4 及び C E A 共に陽性若しくは H L A-A 2 4 及び C E A 関連抗原共に陽性の腫瘍細胞、及び／又は H L A-A 2 4 及び H E R 2 / n e u 共に陽性若しくは H L A-A 2 4 及び H E R 2 / n e u 関連抗原共に陽性の腫瘍細胞を検出することが可能である。

本発明の第 1 0 の態様は、第 1 の態様の C T L を有効成分として含有する、第 1 の態様の C T L に感受性の細胞の検出剤に関する。該検出剤は、該 C T L の保存に適した培地、生理食塩水、又はリン酸緩衝生理食塩水に懸濁した形で供給される。培地としては R P M I、A I M-V 又は X-V I V O 1 0 などの培地が一般的である。また該培地又は緩衝液には血清アルブミン等を C T L 安定化の目的で添加してもよい。該検出剤には第 1 の態様の C T L を、C T L 1 種類当り $10^4 \sim 10^8$ 個 / m l 含有させる。

該検出剤は、被検細胞中における本発明の C T L に感受性細胞の検出の他、被検細胞に発現する H L A が H L A-A 2 4 であるか同定する H L A タイピングに

も用いることが出来る。

本発明の第1の態様は、HLA拘束性抗原ペプチドから選択される少なくとも一つの抗原ペプチド存在下、該抗原ペプチドとHLA分子との複合体を認識可能なCTLを被検細胞と接触させることを特徴とするHLA分子の検出方法に関する。

例えば、被検細胞表面上のHLA-A2.4分子は、第1の態様のCTLと被検細胞を接触させることによって生じる変化を指標に検出することが出来る。CTLと被検細胞の接触により生じる変化としては、例えばCTLによる標的細胞溶解、サイトカイン遊離、又はCTLの増殖が挙げられる。標的細胞溶解の検出は、例えばラジオアイソトープや蛍光色素により被検細胞を標識後CTLと混合した際に、被検細胞より遊離されるラジオアイソトープ量や蛍光色素量を測定することにより実施できる。サイトカイン遊離の検出は、CTL又は被検細胞からのGM-CSF、TNF、IFN- γ 等の遊離量を測定することにより実施することができる。またCTLの増殖は、 ^3H -チミジンの細胞への取り込み量の測定や、顕微鏡観察などによるCTL細胞数の測定などにより実施することが出来る。

上記測定値によりHLA-A2.4分子の発現の有無の検出のみならず、被検細胞上のHLA-A2.4分子の発現量を測定することも可能である。なお被検細胞にMAGE-3、MAGE-1、CEA又はHER2/neuが発現しているか不明の場合には以下の方法によりHLA-A2.4分子を検出することが出来る。本方法においては、反応液中に被検細胞及び最終0.01～50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう配列番号1～6いずれか記載のアミノ酸配列からなる抗原ペプチド及びその機能的誘導体から選択される少なくとも一つの抗原ペプチド、更に該抗原ペプチドとHLA-A2.4分子との複合体を認識する第1の態様のCTLを共存させ、CTLと被検細胞を接触させればよい。

本発明により、補体活性化工程が必須であった従来の抗HLA抗体を用いたHLA分子の検出方法では検出不可能であった腫瘍細胞のHLA-A2.4分子の検

出が可能となる。

なお、本方法において使用する抗原ペプチドは、配列番号 1～6 いずれかに記載のアミノ酸配列で表されるペプチド又はその機能的誘導体から選択される少なくとも 1 つの H L A - A 2 4 拘束性抗原ペプチドに特に限定されなく、種々の H L A 拘束性抗原ペプチドを用いることにより、種々の H L A 分子の検出を行なうことが出来る。例えば、H L A - A 2 拘束性抗原ペプチドを用いることにより H L A - A 2 分子の検出を行なうことも出来る。H L A - A 2 拘束性抗原ペプチドとしては、例えば、配列番号 3 7 で表される M A G E - 3 由来のペプチド、配列番号 3 8 で表されるインフルエンザマトリックスペプチド由来のペプチドが挙げられる。

なお、H L A の各タイプには更にサブタイプが存在する。例えば、H L A - A 2 は、A * 0 2 0 1、A * 0 2 0 6、A * 0 2 0 7 を始めとする 1 0 種類以上のサブタイプに分類される。H L A 拘束性抗原ペプチドは、各サブタイプ間でも異なるため、例えば、制がん剤などとして C T L を利用する時には H L A 分子のサブタイプまで決定することが重要である。抗 H L A 抗体を用いた H L A 分子の検出方法（タイピング）では不可能であったサブタイプの分類が本方法では可能である。例えば、配列番号 3 7 記載のアミノ酸配列を有するペプチドを用いると、A * 0 2 0 1 拘束性の C T L を誘導することが出来、この C T L と該ペプチドを組み合わせ用いることにより、被検細胞の H L A - A 2 分子のサブタイプまで決定することが出来る。なお、本方法は、被検細胞より抽出した D N A を用いる D N A タイピング法より実際の細胞表面上で発現している H L A 分子を検出出来る点で優れている。

実施例

以下、実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

実施例1 MAG E-3 抗原ペプチド特異的CTLの調製(1)

本実施例におけるCTLは、スタフィロコッカス アウレウス コワン-Ⅰ (Staphylococcus aureus Cowan-I ; SAC-I) を用いた誘導法により調製した。

(1) CTL誘導用ペプチドの選択及び合成

314 アミノ酸よりなるMAG E-3タンパク質のアミノ酸配列について、HLA-A24 結合性モチーフ構造を有する配列(N末端より2番目がTyr、Phe、Trp、Metのいずれかのアミノ酸であり、C末端がLeu、Ile、Phe、Trpのいずれかのアミノ酸であるペプチド)を中心に、その他の位置のアミノ酸の種類も考慮して検索した。その結果、MAG E-3抗原ペプチドの候補ペプチドとして表1に示した7個のペプチドが存在することが明らかとなった。

表 1

配列番号	MAG E-3 中の位置	名称
8	76-84	MA3-6
2	113-121	MA3-4
9	142-150	MA3-1
10	142-151	MA3-5
11	150-158	MA3-7
1	195-203	MA3-2
12	195-204	MA3-3

なお、表 1 において配列番号の項の番号は、各ペプチドのアミノ酸配列を示した配列表の配列番号を示す。また M A G E - 3 中の位置の項の番号は、M A G E - 3 タンパクの N 末端からのアミノ酸数を示す。また名称の項の記号は、本発明者らが命名したペプチドの名称を示す。

表 1 に示した M A 3 - 1 ~ M A 3 - 7 の 7 種のペプチドをペプチド合成機 (P S S M - 8 : 島津製作所製) を用い、固相 F m o c 法にて作製した。

(2) P B M C の調製

H L A - A 2 4 を保有する健常人から成分採血により採血を行い、白血球画分を集め更に以下の分離方法に従って P B M C を分離した。すなわち、採血液を R P M I 1 6 4 0 培地で約 2 倍希釈後、フィコールパック (Ficoll-Paque) 分離液 (ファルマシア社製) 上に重層し、 $500 \times g$ で 20 分間室温で遠心した。中間層の P B M C をピペットで回収、洗浄して 90 % 牛胎児血清 (FCS 、インターゲン社製) と 10 % ジメチルスルホキシド (シグマ社製) からなる保存液に懸濁した状態で液体窒素中に保存した。

(3) エフェクター細胞 (e f f e c t o r c e l l) の調製

下記の方法で M A 3 - 1 、 M A 3 - 2 、 M A 3 - 4 、 M A 3 - 6 、 M A 3 - 7 いずれかのペプチドで個別に刺激された 5 種類のエフェクター細胞を調製した。

(2) で調製した保存 P B M C を融解後、細胞濃度が 4×10^6 個 / m l となるように 5 H - R P M I に懸濁した。なお 5 H - R P M I は、R P M I 1 6 4 0 培地にヒト A B 型血清 (アーバインサイエンス社製) を終濃度 5 % (v / v) 、非必須アミノ酸 (ギブコ B R L 社製) を終濃度 0.1 m M 、ピルビン酸ナトリウム (ギブコ B R L 社製) を終濃度 1 m M 、L - グルタミン (ギブコ B R L 社製) を終濃度 4 m M 、硫酸ゲンタマイシン (アーバインサイエンス社製) を終濃度 10

$\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように加えた培地である。細胞懸濁液 2.5 ml を抗 CD 4 抗体を結合した T-150 フラスコ (AIS MicroCELLector、アプライドイミュンサイエンス社製) に入れ 1 時間室温にて反応後、非接着細胞を回収し 2×10^6 個/ ml となるように 5 H-RPMI に懸濁した。この懸濁液を、MA 3-1、MA 3-2、MA 3-4、MA 3-6、MA 3-7 いずれかのペプチドを用い後記実施例 8 の (1) の記載の方法により調製した SAC-1 処理による 5 種類の初回刺激用抗原提示細胞と個別に等量混合し、IL-7 (ジェンザイム社製) を最終濃度 $15\text{ ng}/\text{ml}$ となるように加え、24 ウェル培養プレートの各ウェルに 2 ml ずつ分注し、 37°C の CO_2 インキュベーター内で培養した。翌日、終濃度 $10\text{ ng}/\text{ml}$ となるように IL-10 (R&D 社製) を加えた。6 日後に培養上清を半量除き、 $20\text{ ng}/\text{ml}$ の IL-7 を含む 5 H-RPMI を等量加えた。

更に 3 日間培養を行った後細胞を遠心により回収し、細胞濃度が 2×10^6 個/ ml となるように 5 H-RPMI に懸濁した。この懸濁液を、MA 3-1、MA 3-2、MA 3-4、MA 3-6、MA 3-7 いずれかのペプチドを用い後記実施例 8 の (2) のように調製した抗原提示細胞を含むプレートに $1\text{ ml}/\text{ウェル}$ ずつ加え同一ペプチドによる再刺激を施した。翌日、IL-10 を終濃度 $10\text{ ng}/\text{ml}$ となるように添加し、更に 2 日置きに、培養上清を半量除き、 $20\text{ IU}/\text{ml}$ の rIL-2 (塩野義製薬社製) を含む 5 H-RPMI を等量加え、1 週間 CO_2 インキュベーター内で培養する。同様の再刺激を更に 3 回行った後細胞を回収し、エフェクター細胞とした。

(4) CTL 標的細胞の調製

細胞傷害活性測定のための標的細胞として、HLA-A 24 を発現している EBV トランスフォーム B 細胞である TISI (WSNO 9042) を用いた。まず TISI 細胞を測定前日に (1) で調製した MA 3-1、MA 3-2、MA 3-

－4、MA3－6、MA3－7いずれかのペプチドを個別に $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を含む5種類の培地〔以下、該培地で培養したTISIをTISI(+)と表記〕、又はペプチドを含まない培地〔以下、該培地で培養したTISIをTISI(－)と表記〕中で一晩培養した。測定当日、各 5×10^6 個の、5種類のTISI(+)及びTISI(－)を各々 $200\mu\text{Ci}$ の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ 溶液中に 37°C で1時間混和し、その後10%FCS含有RPMI1640培養液で洗浄し ^{51}Cr 標識した標識標的細胞を調製した。

(5) CTLによる細胞傷害活性の測定

(3)のエフェクター細胞を $5\times 10^5\sim 1\times 10^6$ 個/ ml となるように5H-RPMIで希釈後、96ウェル培養プレートの各ウェルに $100\mu\text{l}$ /ウェルずつ分注しておき、これに(4)で調製した 1×10^4 個の ^{51}Cr 標識標的細胞及び 3×10^5 個のK562細胞を含む $100\mu\text{l}$ の細胞懸濁液を加えた。なおK562細胞は混入するNK細胞による非特異的傷害活性を除くために用いた。

上記細胞懸濁液を $400\times g$ で1分間遠心後、 37°C の CO_2 インキュベーター中に5時間放置した。その後各ウェルの培養液上清 $100\mu\text{l}$ を採取しガンマカウンターを用いて、遊離された ^{51}Cr 量を測定した。

特異的細胞傷害活性は以下の計算式(数1)に従って算出した。

$$\text{特異的細胞傷害活性 (\%)} = \left[\frac{(\text{各ウェルの測定値} - \text{最小放出値})}{(\text{最大放出値} - \text{最小放出値})} \right] \times 100 \quad (\text{数1})$$

上式(数1)において、最小放出値は標的細胞及びK562細胞のみ入っているウェルの ^{51}Cr 量であり、標的細胞からの ^{51}Cr の自然遊離量を示す。また、最大放出値は、標的細胞に界面活性剤トリトンX-100を加えて細胞を破壊し

た際の ^{51}Cr 遊離量を示している。結果を表2に示す。

表 2

ペプチド名	E/T	特異的細胞傷害活性	
		TISI(-)	TISI(+)
MA 3-1	10	1.6	0.8
MA 3-2	10	6.6	65.6
MA 3-4	5	3.1	3.4
MA 3-6	5.8	0.8	0.0
MA 3-7	10	17.0	13.7

表2においてE/Tは標的細胞に対するエフェクター細胞の比を示す。

その結果、MA 3-2で誘導して得られたエフェクター細胞がMA 3-2 ペプチド添加したTISI (+) に対して抗原ペプチド特異的な細胞傷害性を示した。

実施例2 MAGE-3 抗原ペプチド特異的CTLの調製(2)

本実施例におけるCTLは、KLHを用いた誘導法により調製した。なお抗原ペプチドは、実施例1の(1)で調製したMA 3-1、MA 3-2、MA 3-4、MA 3-6、MA 3-7の5種のペプチドを使用した。

(1) PBMCの調製

HLA-A24を保有している健常人から採血を行い、以下の分離方法に従ってPBMCを分離した。すなわち、採血液を同量のRPMI 1640 培地に懸濁

させ、フィコールパック分離液上に重層し、 $500 \times g$ で25分間室温で遠心した。中間層のPBMCをピペットで回収し、15ml遠心管に入れ、RPMI 1640培地で3回洗浄した。次に、細胞最終濃度が 4×10^6 個/mlとなるように5H-RPMIに懸濁した。

(2) エフェクター細胞の調製

下記の方法によりMA3-1、MA3-2、MA3-4、MA3-6、MA3-7いずれかのペプチドで個別に刺激された5種類のエフェクター細胞を調製した。

(1) で調製したPBMCにペプチド $20 \mu g/ml$ を加えた5H-RPMIを等量混合した後、 $37^\circ C$ の CO_2 インキュベーター内で2～3時間放置した。これにKLH (カルビオケム社製) 溶液及びIL-7溶液をそれぞれ最終濃度 $5 \mu g/ml$ 、 $25 ng/ml$ となるように添加した。該細胞懸濁液を24ウェル培養プレートの2ウェルに2mlずつ分注し、 $37^\circ C$ の CO_2 インキュベーター内で培養した。3日後、 $1000 IU/ml$ のrIL-2を含む5H-RPMIを $60 \mu l$ (最終rIL-2濃度 $30 IU/ml$) 加えた。

1週間培養後、細胞を遠心により回収し、細胞濃度が 5×10^5 個/mlとなるように5H-RPMIに懸濁する。この懸濁液を、MA3-1、MA3-2、MA3-4、MA3-6、MA3-7いずれかのペプチドを用い後記実施例8の

(4) 記載の方法により調製した抗原提示細胞のいずれか1種を含む5種類のプレートに1ml/ウェルずつ加え、再刺激した。翌日rIL-2溶液 ($1000 IU/ml$) を $60 \mu l$ 加え、1週間 CO_2 インキュベーター内で培養した。同様の再刺激を更に4回行った後、細胞を回収し、エフェクター細胞とした。

上記の方法で得られた5種のエフェクター細胞を 4×10^6 個/mlとなるように5H-RPMIに懸濁した。

(3) CTL 標的細胞の調製

標識標的細胞として実施例 1 の (4) と同様に調製した T I S I (-)、5 種類の T I S I (+) のほかに M A G E - 3 及び H L A - A 2 4 共に陽性である W i D r (大腸がん細胞株)、T E 1 1 (食道がん細胞株)、M R K n u 1 (乳がん細胞株) を使用した。更に、M A G E - 3 陽性、H L A - A 2 4 陰性のがん細胞株である K A T O - I I I (胃がん細胞株) も使用した。W i D r、T E 1 1、M R K n u 1、及び K A T O - I I I は各 5×10^6 個の細胞を $200 \mu\text{Ci}$ の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ の溶液中に 37°C で 1 時間混和し、その後 10% F C S 含有 R P M I 1 6 4 0 培養液で洗浄することにより ^{51}Cr 標識した。

(4) CTL による細胞傷害活性の測定

(2) で調製したエフェクター細胞及び (3) で調製した標的細胞を用い細胞傷害活性を測定した。標的細胞として T I S I (-) 及び T I S I (+) を用いた場合は実施例 1 の (5) と同様の方法で測定した。なおエフェクター細胞と標的細胞の反応時間は 4.5 時間とした。他の 4 種類の標識がん細胞株を標的細胞として用いた場合は、96 ウェル培養プレートの各ウェルに前記 (2) のエフェクター細胞懸濁液を $100 \mu\text{l}$ / ウェル (4×10^5 個 / ウェル) 分注しておき、これに 5×10^3 個の ^{51}Cr 標識標的細胞及び 1.5×10^5 個の K 5 6 2 細胞を含む $100 \mu\text{l}$ の細胞懸濁液を加えた。 $400 \times g$ で 1 分間遠心後、 37°C の CO_2 インキュベーター中に 4.5 時間放置した。その後各ウェルの培養液上清 $100 \mu\text{l}$ を採取しガンマカウンターを用いて、遊離された ^{51}Cr 量を測定した。特異的細胞傷害活性は実施例 1 の (5) と同様の計算により求めた。結果を表 3 に示す。

表 3

ペプチド名	E/T	特異的細胞傷害活性				
		TISI(-)	TISI(+)	WiDr	TE11	MRKnul
MA 3-1	80	27.6	51.7	ND	ND	ND
MA 3-2	80	7.4	60.5	51.5	39.0	20.9
MA 3-4	80	5.4	39.4	48.7	29.1	27.6
MA 3-6	80	8.7	14.8	ND	ND	ND
MA 3-7	80	21.8	39.4	ND	ND	ND

なお表 3 において E/T は標的細胞に対するエフェクター細胞の比を、ND は未測定であることを示す。

更に、MA 3-2 あるいは MA 3-4 により誘導したエフェクター細胞の TISI(-) 及び TISI(+) に対する各種 E/T での特異的細胞傷害性曲線を図 1 及び図 2 に、WiDr、TE11、MRKnul 細胞に対する各種 E/T での特異的細胞傷害性曲線を図 3 及び図 4 に示す。

図 1 は MA 3-2 で誘導したエフェクター細胞を、図 2 は MA 3-4 で誘導したエフェクター細胞を用いた結果を示す。また四角印 (□) は標的細胞として TISI(+) を、ひし形印 (◇) は TISI(-) を用いた結果を示す。

図 3 は MA 3-2 で誘導したエフェクター細胞を、図 4 は MA 3-4 で誘導したエフェクター細胞を用いた結果を示す。また四角印 (□) は標的細胞として WiDr を、ひし形印 (◇) は TE-11 を、白丸印 (○) は MRKnul を用いた結果を示す。

図 3 及び図 4 に示された細胞傷害活性は、反応系にクラス I 抗体 (W6/32

) を共存させることによって阻害された。また、MA 3-2 あるいは MA 3-4 により誘導されたエフェクター細胞はMAGE-3 陽性及びHLA-A 24 陰性のがん細胞株であるKATO-III には細胞傷害性を示さなかった。

以上の結果より、MA 3-2、MA 3-4 ペプチドにより誘導したエフェクター細胞は抗原ペプチド特異的な細胞傷害性を示すと共に、HLA-A 24 及びMAGE-3 共に陽性のがん細胞株に対して細胞傷害性を示すCTLであった。

実施例3 MAGE-1 抗原ペプチド特異的CTLの調製

本実施例におけるCTLはKLHを用いたCTL誘導法により調製した。

(1) CTL誘導用ペプチドの選択及び合成

309 アミノ酸よりなるMAGE-1 タンパク質のアミノ酸配列〔モレキュラー イムノロジー (Molecular Immunology)、第31巻、第1423～1430 頁(1994)〕について、実施例1の(1)と同様にHLA-A 24 結合性モチーフ構造を有する配列を中心に、その他の位置のアミノ酸の種類も考慮して検索した。その結果、表4に示した5個のペプチドを候補抗原ペプチドとして選択した。

表 4

配列番号	MAGE-1 中の位置	名称
3	135-143	MA1-1
14	135-144	MA1-3
13	188-196	MA1-2
15	188-197	MA1-4
16	275-284	MA1-5

なお、表 4 において配列番号の項の番号は、各ペプチドのアミノ酸配列を示した配列表の配列番号を示す。またMAGE-1 中の位置の項の番号は、MAGE-1 タンパク質のN末端からのアミノ酸数を示す。また名称の項の記号は、本発明者らが命名したペプチドの名称を示す。

表 4 に示したMA1-1～MA1-5 の5種のペプチドをペプチド合成機を用いて作製した。

(2) K L Hを用いた誘導法によるMAGE-1 抗原ペプチド特異的CTLの調製

実施例 3 の(1)で調製したMA1-1、MA1-2、MA1-3、MA1-4、MA1-5 のいずれかのペプチド、及びMA1-1、MA1-2、MA1-3、MA1-4、MA1-5 のいずれかのペプチドを用い後記実施例 8 の(4)記載の方法により調製した抗原提示細胞を用いて実施例 2 の(2)と同様の方法でエフェクター細胞を調製し、各種標的細胞に対する細胞傷害活性を測定した。使用した標的細胞はT I S I (-)、MA1-1、MA1-2、MA1-3、MA1-4、MA1-5 のいずれかのペプチド添加培地で培養した5種類のT I S I (+)の他にMAGE-1 及びHLA-A 2 4共に陽性であるNUGC-3 (胃がん細胞株)、TE-1 1、MAGE-1 陽性及びHLA-A 2 4陰性であるKATO-III、MAGE-1 及びHLA-A 2 4共に陰性であるR a j i (リンフォーマ)である。MA1-1により誘導したエフェクター細胞の各種標的細胞に対する各種E/Tでの特異的細胞傷害性曲線を図 5 に示す。

図 5 において黒丸印(●)は標的細胞としてNUGC-3を、黒四角(■)印はTE 1 1を、逆三角印(▽)はKATO I I Iを、ひし形印(◇)はR a j iを、三角印(△)はT I S I (-)を用いた結果を示す。

更にMA1-1 添加培地を用い得られたT I S I (+)、図 5 に示されたNU

G C - 3 細胞株及び T E - 1 1 細胞株に対する細胞傷害活性は、反応系にクラス I 抗体 (W 6 / 3 2) を共存させることによって阻害された。

したがって M A 1 - 1 で誘導したエフェクター細胞は H L A - A 2 4 及び M A G E - 1 共に陽性のがん細胞株に対する C T L であることが明らかとなった。

実施例 4 C E A 抗原ペプチド特異的 C T L の調製 (1)

本実施例における C T L は、実施例 1 と同様に S A C - I を用いる C T L 誘導法により調製した。

(1) C T L 誘導用ペプチドの選択及び合成

4 6 4 アミノ酸よりなる C E A タンパク質のアミノ酸配列について、H L A - A 2 4 結合性モチーフ構造を有する配列を中心に、その他の位置のアミノ酸の種類も考慮して検索した。その結果、表 5 に示した 5 個のペプチドが存在することが明らかとなった。

表 5

配列番号	C E A タンパク質中の位置	名称
1 7	1 0 1 - 1 0 9	C E - 1
1 8	2 3 4 - 2 4 2	C E - 5
4	2 6 8 - 2 7 7	C E - 2
1 9	3 1 8 - 3 2 6	C E - 4
5	6 5 2 - 6 6 0	C E - 3

なお、表 5 において配列番号の項の番号は、各ペプチドのアミノ酸配列を示し

た配列表の配列番号を示す。またC E Aタンパク質中の位置の項の番号は、C E Aタンパク質中のN末端からのアミノ酸数を示す。また名称の項の記号は、本発明者等が命名したペプチドの名称を示す。

表5に示した5種のペプチドをペプチド合成機を用いて作製した。

(2) エフェクター細胞の調製

実施例1の(2)と同様の方法で調製した保存P BMC、C E - 1、C E - 3、C E - 4、C E - 5のいずれかのペプチドを用い後記実施例8の(1)記載の方法により調製したS A C - 1処理による初回刺激用抗原提示細胞、及びC E - 1、C E - 3、C E - 4、C E - 5のいずれかのペプチドを用い後記実施例8の(2)記載の方法により調製した抗原提示細胞いずれか1種を含む4種のプレートを用い、実施例1の(3)と同様の方法でC E - 1、C E - 3、C E - 4、C E - 5のいずれかのペプチドで個別に刺激された4種類のエフェクター細胞を調製した。

(3) C T L 標的細胞の調製

細胞傷害活性測定のための標的細胞として、実施例1の(4)と同様の方法でC E - 1、C E - 3、C E - 4、C E - 5のいずれかのペプチドを添加した培地で培養し得られた5種のT I S I (+) 及び胃がん細胞株MKN - 4 5 (H L A - A 2 4 及びC E A陽性) を用いた。なお上記各細胞は、細胞傷害活性測定当日実施例1の(4)と同様の方法で⁵¹ C r 標識した。

(4) C T L による細胞傷害活性の測定

(2)のエフェクター細胞及び(3)の標的細胞を用い、実施例1の(5)と同様の方法で特異的細胞傷害活性(%)を算出した。

結果を表6に示す。

表 6

ペプチド名	E/T	TISI (-)	TISI (+)	MKN-45
CE-1	10	24.8	86.7	0.0
CE-3	10	1.9	92.5	9.2
CE-4	10	7.5	5.9	0.2
CE-5	10	4.8	4.6	0.0

表 6 において E/T は標的細胞に対するエフェクター細胞の比を示す。

その結果、CE-3 で誘導して得られたエフェクター細胞が CE-3 ペプチドを添加培地で培養した TISI (+) に対して抗原ペプチド特異的な細胞傷害性を示す共に、MKN-45 に対しても細胞傷害活性を示した。

実施例 5 CEA 抗原ペプチド特異的 CTL の調製 (2)

本実施例における CTL は抗原提示用樹状細胞 (DC) を用いた誘導法により調製した。

実施例 4 の (1) で調製した CE-2 及び CE-3 の 2 種のペプチドについて、健常人の PBMC より各々のペプチドを認識するエフェクター細胞を誘導し細胞傷害活性を測定した。

(1) エフェクター細胞の調製

下記の方法により CE-2 又は CE-3 いずれかのペプチドで個別に刺激された 2 種類のエフェクター細胞を調製した。

実施例 1 の (2) で調製した PBMC を融解後、細胞濃度が 2×10^7 個/m

1 となるように 4 °C の 1 % ヒト A B 血清を含む P B S (以下、1 H - P B S と略す) に懸濁した。 2×10^7 個 / m l の P B M C に対して 1 H - P B S で洗浄した抗 C D 8 抗体を結合したビーズ (Dynabeads M450、ダイナル社製) を $14 \mu\text{l}$ 加え、1 時間 4 °C で反応後非接着細胞を除いた。非接着細胞を除いた後、最初に用いた細胞数 1×10^8 個に対して 0.9 m l の 1 H - P B S に懸濁し、0.1 m l の細胞解離用ビーズ (DETACHaBEAD、ダイナル社製) を加えた。1 時間室温で混和後解離した細胞を回収し 1 H - P B S で洗浄した。洗浄した細胞を 2×10^6 個 / m l となるように 5 H - R P M I に懸濁し、C E - 2 又は C E - 3 いずれかのペプチドを用い実施例 8 の (3) 記載の方法で調製した D C 懸濁液と等量ずつ混和した。この懸濁液に最終濃度 $10 \text{ ng} / \text{ml}$ となるように I L - 7 を加え、48 ウェル培養プレートの各ウェルに 0.5 m l ずつ分注し 37 °C の C O₂ インキュベーター内で培養する。翌日 $100 \text{ ng} / \text{ml}$ の I L - 10 を含む 5 H - R P M I を $50 \mu\text{l}$ 加えた。

1 週間後に各ウェルの培養上清を除き細胞を 0.5 m l の 5 H - R P M I に懸濁した。この懸濁液を C E - 2 又は C E - 3 いずれかのペプチドを用い実施例 8 の (2) 記載の方法で調製した抗原提示細胞いずれか 1 種を含むプレートに加え、再刺激した。翌日、I L - 10 を終濃度 $10 \text{ ng} / \text{ml}$ となるように添加し、更に 2 日置きに、培養上清を半量除き、 $20 \text{ IU} / \text{ml}$ r I L - 2 を含む 5 H - R P M I を等量加え、1 週間 C O₂ インキュベーター内で培養した。同様の再刺激を更に 3 回行った後、各ウェルにおけるエフェクター細胞について T I S I (+)、T I S I (-) に対する細胞傷害活性を測定した。細胞傷害活性を示したエフェクター細胞は個別に抗 C D 3 抗体又は抗原刺激に用いた各ペプチドを用いて増殖させた。増殖した細胞を 5 H - R P M I に懸濁し下記 (3) の方法で細胞傷害活性を測定した。

(2) C T L 標的細胞の調製

標的細胞として実施例 4 の (3) と同様に T I S I (-)、C E - 2 又は C E

－ 3 を添加培地で培養した 2 種類の T I S I (+) を調製した。また M K N - 4 5 は 1 0 0 U / m l の I F N - γ で 3 7 ° C 4 8 時間処理した。上記 4 種の標的細胞は細胞傷害活性測定当日、実施例 4 の (3) 記載と同様の方法により ^{51}Cr 標識した。

(3) C T L による細胞傷害活性の測定

(1) で調製したエフェクター細胞及び (2) で調製した標識標的細胞を用い実施例 1 の (5) 記載の方法と同様に細胞傷害活性を測定した。結果を表 7 に示す。

表 7

ペプチド名	E/T	TISI(-)	TISI(+)	MKN-45
C E - 2	10	0.9	89.1	25.8
C E - 3	10	1.9	92.0	67.9

なお表 7 において E / T は標的細胞に対するエフェクター細胞の比を示す。

その結果、C E - 2 又は C E - 3 いずれかのペプチドで誘導して得られたエフェクター細胞が T I S I (+) 及び M K N - 4 5 に対して抗原ペプチド特異的な細胞傷害性を示し、C E A 特異的な C T L であることが明らかとなった。

実施例 6 H E R 2 / n e u 抗原ペプチド特異的 C T L の調製 (1)

本実施例における C T L は、実施例 1 と同様に S A C - I を用いる C T L 誘導法により調製した。

(1) CTL誘導用ペプチドの選択及び合成

1255アミノ酸よりなるHER2/neuタンパク質のアミノ酸配列について、HLA-A24結合性モチーフ構造を有する配列を中心に、その他の位置のアミノ酸の種類も考慮して検索し、表8に示した5個のペプチドを選択し、ペプチド合成機を用いて作製した。

表 8

配列番号	HER2/neu タンパク質中の位置	名称
6	8-16	HE-1
20	440-448	HE-4
21	780-788	HE-2
22	907-915	HE-5
23	951-959	HE-3

なお、表8において配列番号の項の番号は、各ペプチドのアミノ酸配列を示した配列表の配列番号を示す。またHER2/neuタンパク質中の位置の項の番号は、HER2/neuタンパク質中のN末端からのアミノ酸数を示す。また名称の項の記号は、本発明者等が命名したペプチドの名称を示す。

(2) エフェクター細胞の調製

下記の方法でHE-1～HE-5のいずれかのペプチドで個別に刺激された5種類のエフェクター細胞を調製した。

実施例1の(2)で調製した保存PBMC、HE-1～HE-5いずれかのペ

プチドを用い後記実施例 8 の (1) 記載の方法で調製した SAC-1 処理による初回刺激用抗原提示細胞、及び HE-1~HE-5 いずれかのペプチドを用い後記実施例 8 の (2) 記載の方法で調製した抗原提示細胞いずれか 1 種を含む 5 種のプレートを用い、実施例 1 の (3) と同様の方法で HE-1~HE-5 いずれかのペプチドで刺激された 5 種のエフェクター細胞を調製した。

(3) CTL 標的細胞の調製

細胞傷害活性測定のための標的細胞として、実施例 1 の (4) と同様の方法で HE-1~HE-5 のいずれかのペプチドを含有する培地で培養した 5 種類の TIS1 (+) 並びに卵巣がん細胞株 SKOV3 (HLA-A3 及び HER2/neu 陽性) 及びその HLA-A24 形質転換株 SKOV-A24 (HLA-A24 及び HER2/neu 陽性) を用いた。更に上記細胞は細胞傷害活性測定当日実施例 1 の (4) と同様の方法で ^{51}Cr 標識した。

(4) CTL による細胞傷害活性の測定

(2) のエフェクター細胞及び (3) の標的細胞を用い、実施例 1 の (5) と同様の方法で特異的細胞傷害活性 (%) を算出した。結果を表 9 に示す。

表 9

ペプチド名	E/T	TISI (-)	TISI (+)	SKOV3-A24
HE-1	10	5.3	41.9	4.3
HE-2	10	1.4	0.0	0.4
HE-3	10	68.3	67.2	0.0
HE-4	10	0.4	0.7	0.0
HE-5	10	0.0	9.4	0.9

表 9 において E/T は標的細胞に対するエフェクター細胞の比を示す。

その結果、HE-1 で誘導して得られたエフェクター細胞が HE-1 ペプチド添加培地で培養した TISI (+) に対して抗原ペプチド特異的な細胞傷害性を示した。

実施例 7 HER2/neu 特異的 CTL の調製 (2)

本実施例における CTL は抗原提示用樹状細胞 (DC) を用いた誘導法により調製した。

実施例 6 の (1) で調製した HE-1 ペプチドについて、健常人の PBMC より該ペプチドを認識するエフェクター細胞を誘導し細胞傷害活性を測定した。

(1) エフェクター細胞の調製

実施例 1 の (2) で調製した PBMC、HE-1 ペプチドを用い後記実施例 8 の (3) 記載の方法で調製した DC、及び HE-1 ペプチドを用い後記実施例 8 の (2) 記載の方法で調製した抗原提示細胞を含むプレートを用い、実施例 5 の (1) と同様の方法で HE-1 ペプチドで刺激されたエフェクター細胞を調製し

た。

(2) CTL 標的細胞の調製

標的細胞として実施例 6 の (3) と同様に T I S I (-)、H E - 1 添加培地で培養で培養した T I S I (+) を調製した。また S K O V 3 及び S K O V 3 - A 2 4 は 1 0 0 U / m l の I F N - γ で 3 7 ° C 4 8 時間処理した。上記 4 種の標的細胞は細胞傷害活性測定当日、実施例 1 の (4) と同様の方法により ^{51}Cr 標識した。

(3) CTL による細胞傷害活性の測定

(1) で調製したエフェクター細胞及び (2) で調製した標識標的細胞を用い実施例 1 の (5) 記載の方法と同様に細胞傷害活性を測定した。結果を表 1 0 に示す。

表 1 0

E/T	TISI(-)	TISI(+)	SKOV3-A24	SKOV3
45	8.4	86.2	14.4	6.2
15	3.0	74.6	10.4	5.6
5	3.6	49.1	6.8	3.5

なお表 1 0 において、E / T は標的細胞に対するエフェクター細胞の比を示す。

その結果、H E - 1 ペプチドで誘導して得られたエフェクター細胞が T I S I

(+) 及び SKOV 3-A 24 に対して抗原ペプチド特異的な細胞傷害性を示し、HER 2/neu 特異的な CTL であることが明らかとなった。

実施例 8 非増殖性抗原提示細胞の調製

(1) SAC-I 処理による抗原提示細胞の調製

実施例 1 の (2) で調製した保存 PBMC を融解後、細胞濃度が 2×10^6 個 / ml となるように 5 H-RPMI に懸濁した。細胞懸濁液に SAC-I (Pansorbin cells、カルビオケム社製) を終濃度 0.005%、Immunobeads (Rabbit anti-Human IgM、バイオラド社製) を終濃度 $20 \mu\text{g/ml}$ 、更に IL-4 (ジェンザイム社製) を終濃度 20 ng/ml となるように加え、6 ウェル培養プレートの各ウェルに 5 ml ずつ分注し 37°C の CO_2 インキュベータ内で 4 日間培養した。4 日間培養した細胞を終濃度 1% のウシ血清アルブミン (BSA) を含む生理食塩水で洗浄後、細胞濃度が 1×10^7 個 / ml となるように 1% BSA と $3 \mu\text{g/ml}$ の β_2 ミクログロブリンを含むクエン酸緩衝液 (pH 3.0) で懸濁した後、氷中 2 分間処理した。次に、細胞懸濁液の 5 倍容量の 1% BSA、 β_2 ミクログロブリンを $3 \mu\text{g/ml}$ 及びペプチドを $10 \mu\text{g/ml}$ 含むリン酸緩衝液 (pH 7.5) で細胞を洗浄後、1% BSA と $3 \mu\text{g/ml}$ の β_2 ミクログロブリン及び $50 \mu\text{g/ml}$ のペプチドを含むリン酸緩衝液に懸濁し 20°C で 4 時間反応させた。反応後、X線照射 (5500Rad) を行い細胞濃度が 1×10^6 個 / ml となるように 5 H-RPMI に懸濁し初回刺激用抗原提示細胞を調製した。

(2) 接着細胞からの抗原提示細胞の調製

実施例 1 の (2) で調製した PBMC を融解後 X線照射 (5500Rad) を行った。次いで細胞濃度が 4×10^6 個 / ml となるよう 5 H-RPMI に懸濁した細胞懸濁液を 24 ウェル培養プレートに 1 ml / ウェルずつ分注し、 CO_2 インキ

ュベーター内で1.5時間培養した。その後、非接着細胞を吸引除去し、更に各ウェルをRPMI 1640で洗浄して非接着細胞を除いた。次に、 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ の β_2 ミクログロブリン及び $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチドを含む5H-RPMIを個別に各ウェルに0.5mlずつ分注し、CO₂インキュベーター内で培養した。2時間後に上清を吸引除去し5H-RPMIで1回洗浄し、プレートの各ウェルに残った細胞を再刺激用抗原提示細胞とした。

(3) DCリッチな抗原提示細胞の調製

実施例2の(1)で調製した保存PBMCを融解後、細胞濃度が 2×10^6 個/mlとなるように5H-RPMIに懸濁し、該細胞懸濁液10mlをT-25フラスコ(ヌンク社製)に入れた。1.5時間37℃に放置後、非接着細胞を除き、残った接着細胞に、GM-CSF(ジェンザイム社製)を $1000\text{U}/\text{ml}$ 及びIL-4(ジェンザイム社製)を $2000\text{U}/\text{ml}$ 含む5H-RPMIを、10ml加え、37℃のCO₂インキュベーター内で培養しDC細胞を誘導した。7日後に浮遊細胞を回収した。接着細胞は細胞解離バッファー(ギブコBRL社製)にて回収し5H-RPMIで洗浄後、浮遊細胞と合せた。回収した細胞を、ペプチド $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 β_2 ミクログロブリン $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 及びを含む1%ヒト血清アルブミンを加えた生理食塩水中に 3×10^6 個/mlとなるように懸濁し、20℃の恒温槽中で4時間反応させた。反応後、X線照射(5500Rad)を行った後、 1×10^6 個/mlとなるように1%ヒト血清アルブミンを加えた生理食塩水で希釈し抗原提示細胞とした。

(4) 全PBMCからの抗原提示細胞の調製

実施例2の(1)と同じ方法で分離したPBMCを、マイトマイシン処理し〔PBMC 1×10^7 個/mlの懸濁液にマイトマイシンC(ICNバイオメディカルズ社製)を $200\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように添加し、30分間放置〕、RP

MI 1640 培地で3回洗浄した後、ペプチドをに $20 \mu\text{g} / \text{ml}$ となるよう加えた5H-RPMIを等量混合した後、24ウェル培養プレートに $1 \text{ ml} / \text{ウェル}$ ずつ分注し抗原提示細胞として使用した。

実施例9 CEA抗原ペプチド機能的誘導体の作製

(1) CE-2 改変体及びCE-3 改変体の合成

実施例5の(1)で合成したCE-2を基に表11に示す12種の改変体を設計した。

表 11

配列番号	名称
24	CE-201
25	CE-202
39	CE-203
40	CE-204
41	CE-205
42	CE-206
43	CE-207
44	CE-208
45	CE-209
46	CE-210
47	CE-211
48	CE-212

同様にCE-3を基に表12に示す17種の改変体を設計した。

表 1 2

配列番号	名称
2 6	CE-3 0 1
2 7	CE-3 0 2
2 8	CE-3 0 3
2 9	CE-3 0 4
3 0	CE-3 0 5
3 1	CE-3 0 6
3 2	CE-3 0 7
4 9	CE-3 0 8
5 0	CE-3 0 9
5 1	CE-3 1 0
5 2	CE-3 1 1
5 3	CE-3 1 2
5 4	CE-3 1 3
5 5	CE-3 1 4
5 6	CE-3 1 5
3 3	CE-3 1 6
	CE-3 1 7

表11及び12に示したCE-201~CE-212及びCE-301~CE

－ 3 1 5 の 2 7 種 の ペ プ チ ド を ペ プ チ ド 合 成 機 を 用 い て 作 製 し た。

なお表 1 2 に お ける C E － 3 1 6 は、実 施 例 5 の (1) で 作 製 し た C E － 3 (2 . 8 5 μ m o l) に D H C P (宝 酒 造 社 製) 水 溶 液 (1 0 m g / m l) を 1 0 0 μ l 加 え、 3 7 ° C 、 1 9 時 間 反 応 さ せ た 後 H P L C で 精 製 す る こ と に よ り 作 製 し た。

また C E － 3 1 7 は、配 列 番 号 5 で 表 さ れ る C E － 3 の ア ミ ノ 酸 配 列 に お い て N 末 より 4 番 目 の シ ス テ イ ン の チ オ ール 残 基 を 介 し た ジ ス ル フ ィ ド 結 合 に よ り 2 分 子 の C E － 3 が 結 合 し た C E － 3 の 2 量 体 で あ る。本 ペ プ チ ド は C E － 3 を 0 . 3 m M と な る よ う 溶 解 し た 0 . 0 2 M N H ₄ H C O ₃ 水 溶 液 中 で 3 7 ° C 、 2 4 時 間 反 応 さ せ た 後 H P L C で 精 製 す る こ と に よ り 作 製 し た。

(2) C E － 2 又 は C E － 3 の 機 能 的 誘 導 体 の 同 定

C E － 2 又 は C E － 3 と H L A － A 2 4 分 子 と の 複 合 体 を 認 識 す る 実 施 例 4 に お い て 得 ら れ た C T L が、表 1 1 及 び 表 1 2 に 示 し た ペ プ チ ド 又 は ペ プ チ ド 類 似 体 と H L A － A 2 4 分 子 と の 複 合 体 を 認 識 す る か 確 認 し た。

先 ず 実 施 例 4 の (2) と 同 様 の 方 法 で 調 製 し た C E － 2 を 認 識 す る C T L が、⁵¹ C r 標 識 T I S I (-) 細 胞、及 び C E － 2 0 1 ～ C E － 2 1 2 ペ プ チ ド の い ず れ か 1 つ を 用 い 実 施 例 4 の (3) と 同 様 の 方 法 で 調 製 し た 1 2 種 の ⁵¹ C r 標 識 T I S I (+) 細 胞 に 対 し 傷 害 性 を 示 す か 確 認 し た。そ の 結 果 C E － 2 を 認 識 す る C T L は、C E － 2 0 1、C E － 2 0 3、C E － 2 0 4、C E － 2 0 6、C E － 2 0 7、C E － 2 0 8、C E － 2 0 9、C E － 2 1 0、C E － 2 1 2 を 添 加 し た 培 地 で の 培 養 に よ り 得 ら れ た ⁵¹ C r 標 識 T I S I (+) に 対 し 明 ら か な 細 胞 傷 害 性 を 示 し た。な お 該 C T L は、⁵¹ C r 標 識 T I S I (-) 細 胞 に 対 し て は 細 胞 傷 害 性 を 示 さ ず、C E － 2 0 1、C E － 2 0 3、C E － 2 0 4、C E － 2 0 6、C E － 2 0 7、C E － 2 0 8、C E － 2 0 9、C E － 2 1 0、C E － 2 1 2 が C E － 2 の 機 能 的 誘 導 体 で あ る こ と が 明 ら か と な っ た。

4人の健常人PBMCを出発材料として実施例4の(2)と同様の方法で調製して得られた、CE-3を認識する出発材料が異なる4種のCTLが、 ^{51}Cr 標識TISI(-)細胞及び表12に示した17種のペプチドのいずれか1つを用い実施例4の(3)と同様の方法で調製した17種の ^{51}Cr 標識TISI(+)細胞に対し傷害性を示すか確認した。その結果CE-3を認識するCTLは、CE-301、CE-302、CE-305、CE-307、CE-310、CE-311、CE-312、CE-314、CE-316、CE-317いずれかのペプチドを個別に添加した培地での培養により得られた10種の ^{51}Cr 標識TISI(+)に対し明らかな細胞傷害性を示した。なお該CTLは ^{51}Cr 標識TISI(-)細胞に対しては細胞傷害性を示さず、CE-301、CE-302、CE-305、CE-307、CE-310、CE-311、CE-312、CE-314、CE-316、CE-317がCE-3の機能的誘導体であることが明らかとなった。

実施例10 CTLを用いたHLA-A24分子の検出

本発明のCTLによりHLA-A24分子が検出出来るかヒト由来PBMCを被検細胞として検討した。

従来法の抗HLA抗体を用い、発現しているHLAタイプの判明している8人より実施例1の(2)と同様の方法でPBMCを調製し、被検細胞用PBMC8検体とした。各検体を2つに分け、一方は $10\mu\text{g/ml}$ となるようにCE-3を溶解した5H-RPMIに各々懸濁し、これをCE-3添加検体群とした。もう一方は5H-RPMIに各々懸濁し、これをCE-3無添加検体群とした。各群を 37°C で2時間放置後、遠心分離操作により細胞を回収し、上清を除去した。本操作によりCE-3添加群より過剰のCE-3を除去した。次いで上記16種の細胞を5H-RPMIに懸濁後、96ウェルマイクロプレートの各ウェルに各々 1×10^4 個ずつ分注した。次いで各ウェルに実施例4においてCE-3を

用い得られたCTLを 3×10^4 個ずつ加え、 37°C 、22時間 CO_2 インキュベーター内に放置後、各ウェル上清中のIFN- γ 量をデュオセット (Duo set; ジェンザイム (Genzyme) 社製) により測定した。その結果CE-3 添加群の内、HLA-A24 分子を発現しているヒトより調製したPBMC 5 検体を分注したウェルにのみIFN- γ の存在が確認された。なお対照としたCE-3 無添加群のいずれのウェルのIFN- γ 量は検出限界以下であった。従って本発明のCTLを用いることによりHLA-A24 分子を検出出来ることが明らかとなった。

一方、CE-3 添加群においてIFN- γ の存在が認められたPBMC 検体のうち、HLA-A24 ホモのヒトより調製したPBMC 検体を分注したウェルにおけるIFN- γ 量は、HLA-A24 ヘテロのヒトより調製したPBMC 検体を分注したウェルにおけるIFN- γ 量の約2 倍量存在した。従って本発明のCTLを用いることによりHLA-A24 発現量を推定出来ることが明らかとなった。

実施例 11 CTLを用いたHLA-A2 分子の検出及びHLA-A2 サブタイプの同定

配列番号37 記載のアミノ酸配列で表されるMAGE 3 由来のHLA-A2 拘束性ペプチドであるFLWGPRA Δ LVを用いて、実施例1 (3) と同様の方法で、HLA-A2 (A* 0201) を保有する健常人由来のPBMCよりエフェクター細胞を調製した。標的細胞としてHLA-A2 細胞である . 221 (A2 . 1) 細胞を細胞傷害性測定前日に上記ペプチド $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ を含む培地 (. 221 (A2 . 1) (+)) 又は含まない培地 (. 221 (A2 . 1) (-)) で培養したものを使用した。測定当日、 ^{51}Cr 標識した . 221 (A2 . 1) (+) 又は . 221 (A2 . 1) (-) 細胞とエフェクター細胞を混和し、5 時間後培地中に遊離された ^{51}Cr 量を測定した。その結果、調製したエフェクター細胞

胞がペプチド特異的な傷害性を示すCTLであることが明らかとなった。また、. 2 2 1 (A 2. 1) (+) 又は . 2 2 1 (A 2. 1) (-) 細胞とCTLを混和し1日後の上清中のIFN- γ を測定したところ、エフェクター細胞であるCTLがペプチド特異的にIFN- γ を遊離することが明らかとなった。このCTLを増やした後、各種HLA-A 2細胞に対してペプチド特異的なIFN- γ 遊離作用の有無を検討した。

1) 株化細胞 . 2 2 1 (A 2. 1) (HLA-A* 0 2 0 1)、CLA (HLA-A* 0 2 0 6)、FUN (HLA-A* 0 2 0 3)、p 8 1 5 (HLA-A* 0 2 0 2) に対する反応性

上記各細胞にペプチドFLWGPRA LVを10 μ g/mlとなるように添加し、37℃で4時間インキュベートした。過剰のペプチドを洗浄除去後、96ウェルマイクロプレートに1 \times 10⁴ 個/0. 1ml/ウェル入れ、これにCTL細胞を1 \times 10⁵ 個/0. 1ml/ウェル加え、20時間反応させた。対照としてペプチド無添加細胞を用意し、同様にCTL細胞と反応させた。反応液より上清を取り適当に希釈後、IFN- γ 量を定量した。その結果、このCTLは、. 2 2 1 (A 2. 1) (HLA-A* 0 2 0 1) に対してのみ、ペプチド特異的なIFN- γ の遊離を起こしていた。

2) ヒトPBMCに対する反応性

ボランティア健康人3人のPBMC (A氏: HLA-A* 0 2 0 7/A 1 1、B氏: A* 0 2 0 6/A 2 4、C氏: A* 0 2 0 1/A* 0 2 0 6) にペプチドFLWGPRA LVを10 μ g/mlとなるように添加し、37℃で2時間インキュベートした。過剰のペプチドを洗浄除去後、96ウェルマイクロプレートに各1 \times 10⁴ 個/0. 1ml/ウェル入れ、これにCTL細胞を1 \times 10⁴ 個/0. 1ml/ウェル加え、20時間反応させた。対照としてペプチド無添加細胞を用意し、同様にCTL細胞と反応させた。反応液より上清を取り適当に希釈後、IFN- γ 量を定量した。その結果、このCTLは、HLA-A* 0 2 0 1を

有するC氏のPBMCに対してのみ、ペプチド特異的なIFN- γ の遊離を起こしていた。

上記1)、2)の結果より、HLA-A2拘束性ペプチド及びそのペプチドでHLA-A*0201のPBMCより誘導したCTLを用いることにより、被検細胞についてDNAタイピングを実施することなく、HLA-A2のサブタイプまで同定できることが明らかとなった。

配列表フリーテキスト

配列番号33のアミノ酸配列の4番目のアミノ酸は、2-ハイドロキシー-4(R, S)-L-システイン-S-イル-2-シクロペンテン-1-オンである。

産業上の利用可能性

本発明のCTLはHLA-A24及びMAGE-3共に陽性、HLA-A24及びMAGE-1共に陽性、HLA-A24及びCEA共に陽性、又はHLA-A24及びHER2/neu共に陽性の腫瘍細胞を選択的に傷害することができ、がん治療を目的とした細胞医薬として、また、体外摘出試料中のHLA-A24及びMAGE-3共に陽性の腫瘍細胞、HLA-A24及びMAGE-1共に陽性、HLA-A24及びCEA共に陽性、又はHLA-A24及びHER2/neu共に陽性の腫瘍細胞の有無の検出、更に抗原ペプチドと同時に使用することにより体外摘出試料中の細胞のHLAタイピング等に有用である。また本発明の抗原提示細胞は該CTLを調製するあるいは制がん剤として有用である。更に本発明の抗原ペプチドを有効成分とした医薬用組成物はCTLの誘導剤更には制がん剤として有用である。

請求の範囲

1. 配列番号 1 ～ 6 のいずれかに記載のアミノ酸配列で表されるヒト主要組織適合性抗原（HLA）－A 2 4 拘束性抗原ペプチド及びその機能的誘導体から選択される少なくとも一つの抗原ペプチドとHLA－A 2 4 分子との複合体を細胞表面に提示する細胞を認識する細胞傷害性Tリンパ球。
2. 請求項 1 記載の細胞傷害性Tリンパ球を有効成分として含有してなる制がん剤。
3. 配列番号 1 ～ 6 のいずれかに記載のアミノ酸配列で表されるヒト主要組織適合性抗原（HLA）－A 2 4 拘束性抗原ペプチド及びその機能的誘導体から選択される少なくとも一つの抗原ペプチドを使用することを特徴とする請求項 1 記載の細胞傷害性Tリンパ球の誘導方法。
4. 配列番号 1 ～ 6 のいずれかに記載のアミノ酸配列で表されるヒト主要組織適合性抗原（HLA）－A 2 4 拘束性抗原ペプチド及びその機能的誘導体から選択される少なくとも一つの抗原ペプチドを有効成分として含有してなる、請求項 1 記載の細胞傷害性Tリンパ球の誘導剤。
5. 配列番号 1 ～ 6 のいずれかに記載のアミノ酸配列で表されるヒト主要組織適合性抗原（HLA）－A 2 4 拘束性抗原ペプチド及びその機能的誘導体から選択される少なくとも一つの抗原ペプチドを有効成分として含有してなる制がん剤。
6. 配列番号 1 ～ 6 のいずれかに記載のアミノ酸配列で表されるヒト主要組織

適合性抗原（H L A）－A 2 4 拘束性抗原ペプチド及びその機能的誘導体から選択される少なくとも一つの抗原ペプチドとH L A－A 2 4 分子との複合体を細胞表面に提示してなる抗原提示細胞。

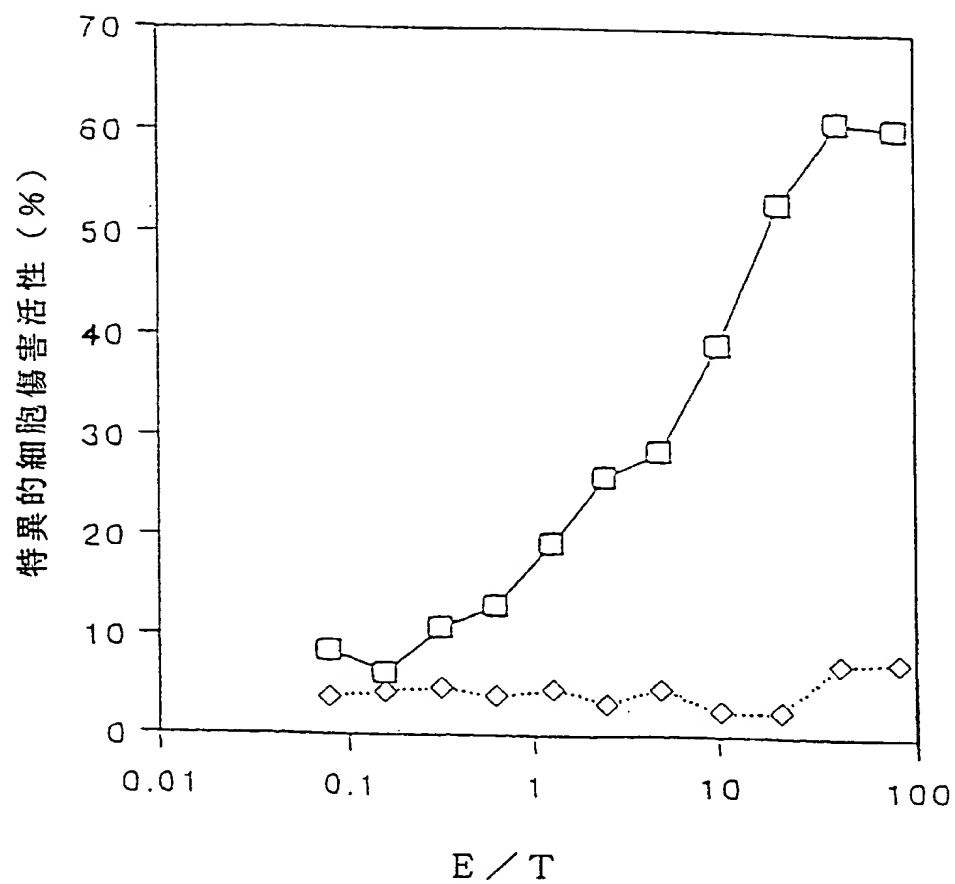
7. 請求項 6 記載の抗原提示細胞を有効成分として含有してなる細胞傷害性 T リンパ球の誘導剤。

8. 請求項 6 記載の抗原提示細胞を有効成分として含有してなる制がん剤。

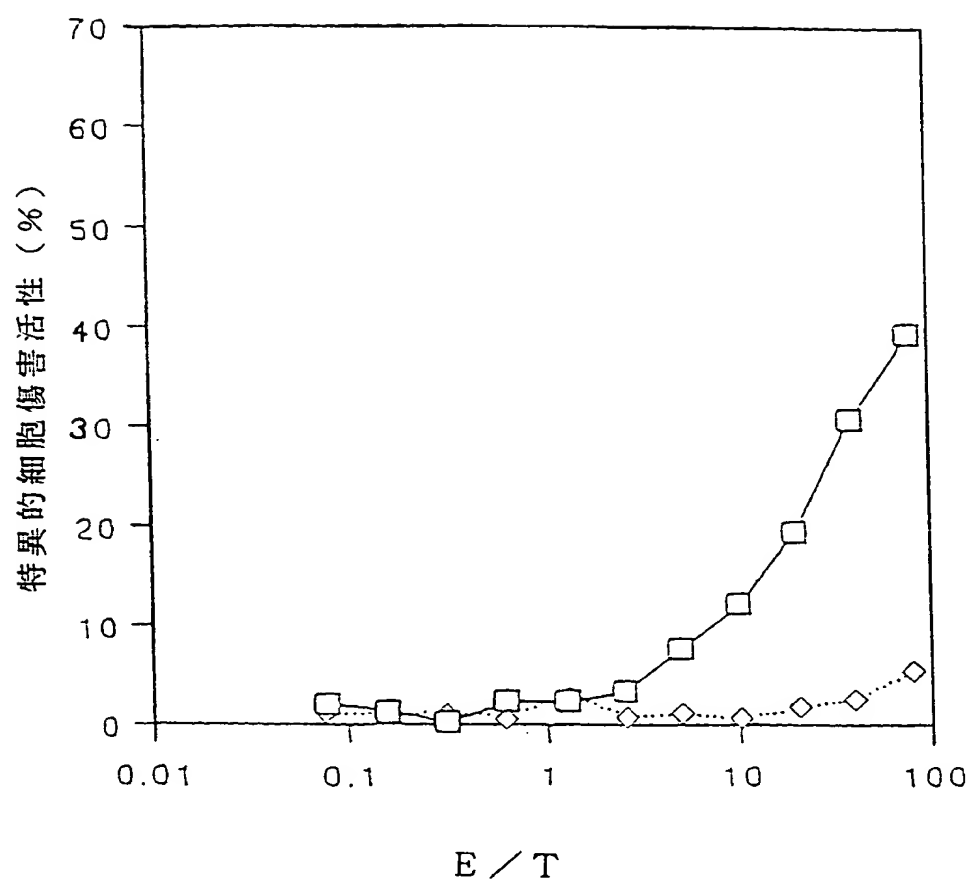
9. 請求項 1 記載の細胞傷害性 T リンパ球を被検細胞と接触させた際に生じる変化を指標とすることを特徴とする請求項 1 記載の細胞傷害性 T リンパ球に感受性の細胞の検出方法。

10. 請求項 1 記載の細胞傷害性 T リンパ球を有効成分として含有してなる、請求項 1 記載の細胞傷害性 T リンパ球に感受性の細胞の検出剤。

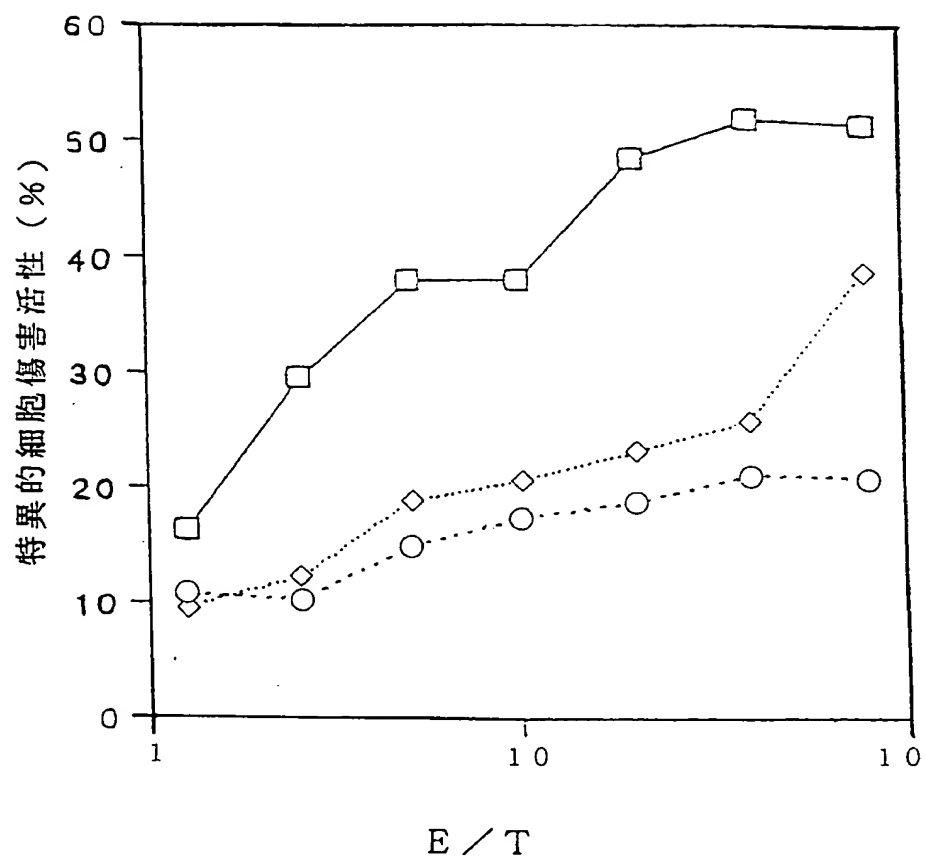
11. ヒト主要組織適合性抗原（H L A）拘束性抗原ペプチドから選択される少なくとも一つの抗原ペプチド存在下、該抗原ペプチドとH L A分子との複合体を認識する細胞傷害性 T リンパ球を被検細胞と接触させることを特徴とするヒト主要組織適合性抗原（H L A）分子の検出方法。



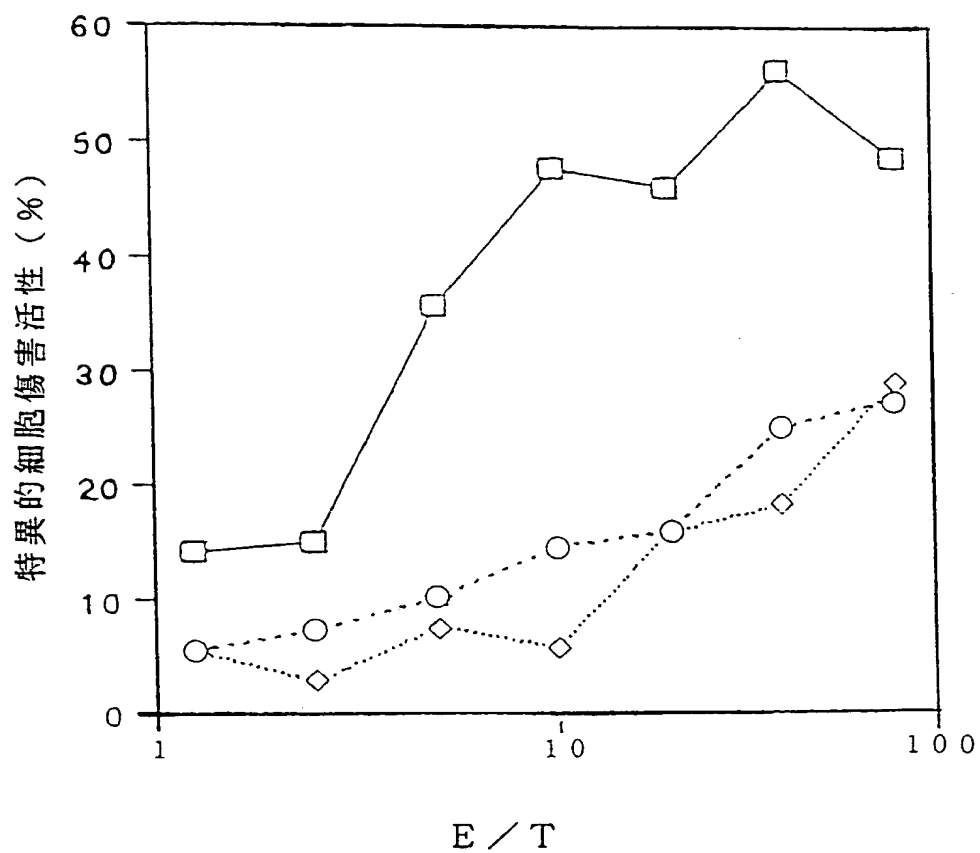
第 1 図



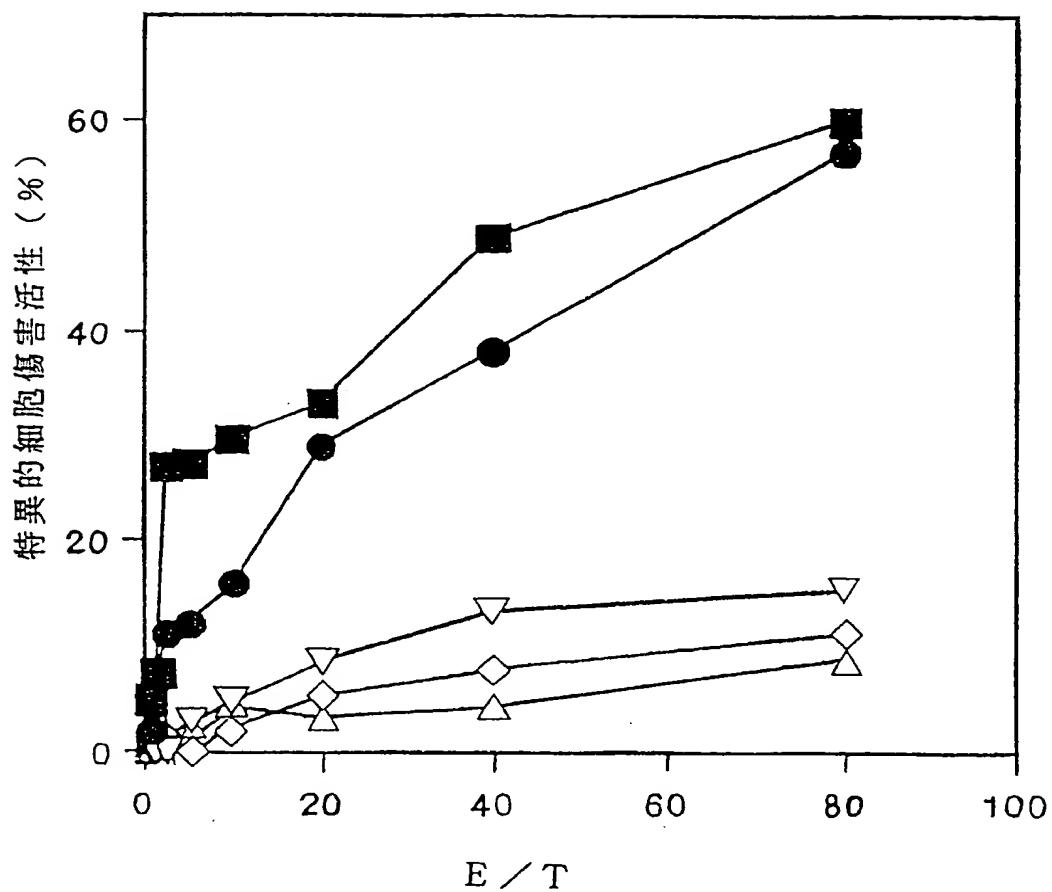
第 2 図



第 3 図



第 4 図



第 5 図

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> Cytotoxic T Lymphocytes

<130> 98-029-PCT

<160> 56

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ile Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile

1 5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu

1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Asn Tyr Lys His Cys Phe Pro Glu Ile

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn Gly Thr Phe

1 5 10

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Arg Trp Gly Leu Leu Leu Ala Leu Leu

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr

1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

Asn Tyr Pro Leu Trp Ser Gln Ser Tyr

1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Asn Trp Gln Tyr Phe Phe Pro Val Ile

1 5

<210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Asn Trp Gln Tyr Phe Phe Pro Val Ile Phe

1 5 10

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ile Phe Ser Lys Ala Ser Ser Ser Leu

1 5

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Ile Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile

1 5 10

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Ile Met Pro Lys Thr Gly Phe Leu Ile

1 5

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Asn Tyr Lys His Cys Phe Pro Glu Ile Phe

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Ile Met Pro Lys Thr Gly Phe Leu Ile Ile

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

Ser Tyr Val Lys Val Leu Glu Tyr Val Ile

1 5 10

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

Ile Tyr Pro Asn Ala Ser Leu Leu Ile

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Leu Tyr Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile

1 5

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Val Tyr Ala Glu Pro Pro Lys Pro Phe

1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly Ile

1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Val Tyr Met Ile Met Val Lys Cys Trp

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Ala Tyr Ser Leu Thr Leu Gln Gly Leu

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Ser Tyr Gly Val Thr Val Trp Glu Leu

1 5

<210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 24

Gln Tyr Ser Trp Phe Ile Asn Gly Thr Phe

1 5 10

<210> 25

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 25

Gln Tyr Ser Trp Leu Ile Asn Gly Thr Phe

1 5 10

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 26

Ala Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Leu

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 27

Thr Tyr Ala Ala Phe Val Ser Asn Leu

1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 28

Thr Tyr Ala Cys Ala Val Ser Asn Leu

1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 29

Thr Tyr Ala Cys Phe Ala Ser Asn Leu

1

5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 30

Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ala Asn Leu

1

5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 31

Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Ala Leu

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 32

Thr Tyr Ala Cys Phe Val Ser Asn Ala

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> MOD_RES

<222> 4

<223> Xaa is 2-hydroxy-4(R,S)-L-cystein-S-yl-2-cyclopenten-1-one.

<400> 33

Thr Tyr Ala Xaa Phe Val Ser Asn Leu

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Tyr Leu Ser Gly Ala Asn Leu Asn Leu

1 5

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu

1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

His Leu Tyr Gln Gly Cys Gln Val Val

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val

1 5

<210> 38

<211> 9

<212> PRT

<213> Influenza virus

<400> 38

Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu

1 5

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 39

Ala Tyr Ser Trp Phe Val Asn Gly Thr Phe

1 5 10

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 40

Gln Ala Ser Trp Phe Val Asn Gly Thr Phe

1 5 10

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 41

Gln Tyr Ala Trp Phe Val Asn Gly Thr Phe

1 5 10

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 42

Gln Tyr Ser Ala Phe Val Asn Gly Thr Phe

1 5 10

<210> 43

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 43

Gln Tyr Ser Trp Ala Val Asn Gly Thr Phe

1 5 10

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 44

Gln Tyr Ser Trp Phe Ala Asn Gly Thr Phe

1 5 10

<210> 45

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 45

Gln Tyr Ser Trp Phe Val Ala Gly Thr Phe

1 5 10

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 46

Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn Ala Thr Phe

1 5 10

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 47

Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn Gly Ala Phe

1 5 10

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 48

Gln Tyr Ser Trp Phe Val Asn Gly Thr Ala

1 5 10

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 49

Thr Tyr Ala Asp Phe Val Ser Asn Leu

1 5

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 50

Thr Tyr Ala Pro Phe Val Ser Asn Leu

1

5

<210> 51

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 51

Thr Tyr Ala Ser Phe Val Ser Asn Leu

1

5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 52

Thr Tyr Ala Gly Phe Val Ser Asn Leu

1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 53

Thr Tyr Ala Cys Phe Ile Ser Asn Leu

1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 54

Thr Tyr Ala Cys Phe Asp Ser Asn Leu

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 55

Thr Tyr Ala Cys Phe Met Ser Asn Leu

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> VARIANT

<400> 56

Thr Tyr Ala Cys Phe Lys Ser Asn Leu

1

5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03143

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁶ C12N5/00, C12Q1/04, A61K35/14, 38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁶ C12N5/00, C12Q1/04, A61K35/14, 38/17, C07K14/74

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO, 97/34617, A (CYTAL CORPORATION), September 25, 1997 (25. 09. 97) & AU, 9723365, A	1-11
X, P	FUMIAKI TANAKA, TATSUO FUJIE, KOUICHIROU TAHARA, MASAKI MORI, KAZUTOH TAKESAKO, ALESSANDRO SETTE, ESTEBAN CELIS, TSUYOSHI AKIYOSHI, "Induction of Antitumor Cytotoxic T Lymphocytes with a MAGE-3-encoded Synthetic Peptide Presented by Human Leukocytes Antigen-A24", Cancer Research, 1997, Vol. 57, No. 20, P.4465-4468	1-11
Y	ESTEBAN CELIS, VAN TSAI, CLAIRE CRIMI, ROBERT DEMARS, REGGY A. WENTWORTH, ROBERT W. CHESNUT, HOWARD, M. GRAY, ALESSANDRO SETTE, HORACIO M. SERRA, "Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, Vol. 91, P.2105-2109	1-4, 7, 9-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

 Date of the actual completion of the international search
 July 30, 1998 (30. 07. 98)

 Date of mailing of the international search report
 August 11, 1998 (11. 08. 98)

 Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03143

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	TANAKA F., FUJIE T., GO H., BABA K., MORI T., TAKESAKO K., AKIYOSHI T., "Efficient induction of antitumor cytotoxic T lymphocytes from a healthy donor using HLA-A2-restricted MAGE-3 peptide in vitro", Cancer Immunology Immunotherapy, 1997, Vol. 44, P.21-26	1-4, 7, 9-11
X Y	ESTEBAN CELIS, JOHN FIKES, PEGGY WENTWORTH, JOHN SIDNEY, SCOTT SOUTHWOOD, AJESH MAEWAL, MARIE-FRANCE DEL GUERCIO, ALESSANDRO SETTE, BRAIAN LIVINGSTON, "IDENTIFICATION OF POTENTIAL CTL EPITOPES OF TUMOR-ASSOCIATED ANTIGEN MAGE-1 FOR FIVE COMMON HLA-A ALLELES, Molecular Immunology, 1994, Vol. 31, No. 18, P.1423-1430	5, 6, 8 1-4, 7, 9-11
X Y	XIAOQIANG KANG, YUTAKA KAWAKAMI, MONA EL-GAMIL, RONGFU WANG, KAZUYASU SAKAGUCHI, JOHN R. YANNELLI, ETTORE APPELLA, STEVEN A. ROSENBERG, PAUL F. ROBBINS, "Identification of a Tyrosinase Epitope Recognized by HLA-A24-Restricted, Tumor-Infiltrating Lymphocytes", The Journal of Immunology, 1995, Vol. 155, No. 3, P.1343-1348	1-11 1-4, 7, 9-11
X	PAUL F. ROBBINS, MONA EL-GAMIL, YONG F. LI, YUTAKA KAWAKAMI, DOUGLAS LOFTUS, ETTORE APPELLA, STEVEN A. ROSENBERG, "A Mutated beta.-Catenin Gene Encodes a Melanoma-specific Antigen Recognized by Tumor Infiltrating Lymphocytes", Journal of Experimental Medicine, 1996, Vol. 183, No. 3, P.1185-1192	1, 2, 5, 6, 8-11

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C12N5/00, C12Q1/04, A61K35/14, 38/17

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl[°] C12N5/00, C12Q1/04, A61K35/14, 38/17, C07K14/74

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN)
REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X, P	WO, 97/34617, A (CYTAL CORPORATION) 25. 9月. 1997 (25. 09. 97) & AU, 9723365, A	1-11
X, P	FUMIAKI TANAKA, TATSUO FUJIE, KOUICHIROU TAHARA, MASAKI MORI, KA ZUTOH TAKESAKO, ALESSANDRO SETTE, ESTEBAN CELIS, TSUYOSHI AKIYO SHI, "Induction of Antitumor Cytotoxic T Lymphocytes with a M AGE-3-encoded Synthetic Peptide Presented by Human Leukocyte s Antigen-A24", Cancer Research, 1997, Vol. 57, No. 20, P. 4465-4468	1-11
Y	ESTEBAN CELIS, VAN TSAI, CLAIRE CRIMI, ROBERT DEMARS, REGGY A. WE NTWORTH, ROBERT W. CHESNUT, HOWARD M. GRAY, ALESSANDRO SETTE, HORA CIO M. SERRA, "Induction of anti-tumor cytotoxic T lymphocytes	1-4, 7, 9-11

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 07. 98

国際調査報告の発送日

11.08.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之

4B

9165

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	in normal humans using primary cultures and synthetic peptide epitopes", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1994, Vol. 91, P. 2105-2109,	
Y	TANAKA F., FUJIE T., GO H., BABA K., MORI T., TAKESAKO K., AKIYOSH I T., "Efficient induction of antitumor cytotoxic T lymphocytes from a healthy donor using HLA-A2-restricted MAGE-3 peptide in vitro", Cancer Immunology Immunotherapy, 1997, Vol. 44, P. 21-26	1 - 4, 7, 9 - 11
X Y	ESTEBAN CELIS, JOHN FIKES, PEGGY WENTWORTH, JOHN SIDNEY, SCOTT S OUTHWOOD, AJESH MAEWAL, MARIE-FRANCE DEL GUERCIO, ALESSANDRO SE TTE, BRAIAN LIVINGSTON, "IDENTIFICATION OF POTENTIAL CTL EPITOPES OF TUMOR-ASSOCIATED ANTIGEN MAGE-1 FOR FIVE COMMON HLA-A ALLELES, Molecular Immunology, 1994, Vol. 31, No. 18, P. 1423-1430	5, 6, 8 1 - 4, 7, 9 - 11
X Y	XIAOQIANG KANG, YUTAKA KAWAKAMI, MONA EL-GAMIL, RONGFU WANG, KAZ UYASU SAKAGUCHI, JOHN R. YANNELLI, ETTORRE APPELLA, STEVEN A. ROSE NBERG, PAUL F. ROBBINS, "Identification of a Tyrosinase Epitope Recognized by HLA-A24-Restricted, Tumor-Infiltrating Lymphocytes", The Journal of Immunology, 1995, Vol. 155, No. 3, P. 1343-1348	1 - 11 1 - 4, 7, 9 - 11
X	PAUL F. ROBBINS, MONA EL-GAMIL, YONG F. LI, YUTAKA KAWAKAMI, DOUGLAS LOFTUS, ETTORRE APPELLA, STEVEN A. ROSENBERG, "A Mutated beta.-Catenin Gene Encodes a Melanoma-specific Antigen Recognized by Tumor Infiltrating Lymphocytes", Journal of Experimental Medicine, 1996, Vol. 183, No. 3, P. 1185-1192	1, 2, 5, 6, 8 - 11